REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON INSULINABBAUAKTIVITÄTEN AUS RATTENLEBERMIKROSOMEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

GÜNTER MÜLLER

aus Bad Soden

1984

REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON INSULINABBAUAKTIVITÄTEN AUS RATTENLEBERMIKROSOMEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

GÜNTER MÜLLER

aus Bad Soden

1984

Tag der mündlichen Prüfung:	27. 7. 1984
Dekan:	Prof. Dr. J. Strähle
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. U. Weber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Eisele

Gesamtherstellung **aku**-Fotodruck Bamberg

Die vorliegende Arbeit wurde am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Ulrich Weber durchgeführt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Ulrich Weber für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung dieser Arbeit.

Den Herren Dr. Rüdiger Koch und Dr. Karl-Norbert Klotz danke ich für die anregenden Diskussionen.

Meinen Laborkollegen, den Herren Diplom-Biochemikern Heiner Böttinger, Arno Deger, Hans-Martin Jäck, Sørge Kelm, Reinhard Rapp, Herrn cand, biochem. Helmut Krämer und Frau Uschi Heckel danke ich für die gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Mein besonderer Dank gilt Herrn cand. biochem. Eberhard Trummer für die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

A B S T R A C T

MÜLLER, GÜNTER

REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON INSULINABBAUAKTIVITÄTEN AUS RATTENLEBERMIKROSOMEN

Mittels Triton X-100 wurden die Abbauaktivitäten aus den Lebermikrosomen herausgelöst, zur Triton-Entfernung an Servachrom XAD-2 chromatographiert, an DEAE-Sephadex A50 aufgetrennt und durch Gelfiltration sowie präparative Polyacrylamidgelelektrophorese weiter gereinigt.

Umfang und Art des Insulinabbaus wurden durch Trichloressigsäure-Fällung, Radioimmunoassay, Gelfiltration und Elektrophorese der Insulinabbauprodukte bestimmt. Mit diesen Methoden konnte außerdem die Reaktion von N-Ethylmaleimid mit Amino-Funktionen des Insulins nachgewiesen werden.

Es wurden vier Abbauaktivitäten (A, B1A, B1B und C) isoliert. Aktivität A hat ein pH-Optimum von 4,5 und stellt vermutlich ein lysosomales Enzym dar. Es entspricht vom Abbauverhalten her dem Cathepsin D. Die Aktivität B1A baut Insulin proteolytisch ab und ist durch Glutathion (reduziert) stimulierbar. Sie besitzt keine Abhängigkeit gegenüber Komplexbildnern oder Ca^{++}, Mg^{++}und Mn^{++}. Sie ist durch SH-Blocker hemmbar und baut im Bereich von pH 7,4 ab. Ihr Molekulargewicht beträgt 68 000 im reduzierten und 56 000 im nichtreduzierten Zustand. Die Aktivität B1B entspricht vom Abbauverhalten der Aktivität B1A. Der einzige Unterschied besteht im Molekulargewicht von 56 000 im reduzierten wie nichtreduzierten Zustand. Beide Aktivitäten können bisher keiner der in der Literatur beschriebenen Proteasen aus Lebermikrosomen zugeordnet werden. Die Aktivität C spaltet Insulin reduktiv. Als Co-Substrat dient Glutathion (reduziert). Die Inhibierbarkeit und Aktivierbarkeit von Aktivität C entspricht der von B1A und B1B. Sie baut im Bereich von pH 7,4 ab und besitzt ein Molekulargewicht von 53 000 im reduzierten wie nichtreduzierten Zustand. Vom Abbauverhalten her handelt es sich um Glutathion-Insulin-Transhydrogenase.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Zelluläre Insulinabbauwege	2
1.2.	Abhängigkeit von Insulinabbau und Insulinwirkung	7
1.3.	Aufgabenstellung	9
2.	ABKÜRZUNGEN UND SCHREIBWEISEN	10
3.	MATERIAL	12
3.1.	Chemikalien	13
3.2.	Verbrauchsmaterial	14
3.3.	Geräte	14
4.	METHODEN	16
4.1.	Reinigung von Insulin	16
4.2.	Präparation von 125J-Insulin	16
4.2.1.	Jodierung mit Chloramin T	16
4.2.2.	Jodierung mit Lactoperoxidase	18
4.3.	Präparation von 125J-MABI	20
4.4.	Präparation von Dansyl-Insulin oder Dansyl-Aminosäuren	21
4.5.	Proteinbestimmung	23
4.6.	Elektrophoresemethoden	24
4.6.1.	Analytische Elektrophoresemethoden	24
4.6.1.1.	Durchführung der Elektrophoresen	24
4.6.1.2.	Färbung und Trocknung von Gelen	26
4.6.1.3.	Autoradiographie von Gelen	27
4.6.2.	Präparative Elektrophorese	27
4.6.2.1.	Gelherstellung	27
4.6.2.2.	Probenvorbereitung	28
4.6.2.3.	Elektrophorese	28
4.7.	Nachweismethoden für Insulin und Insulinfragmente	29
4.7.1.	TCA-Fällung	30

		Seite
4.7.2.	Bestimmung des immunreaktiven Insulins	30
4.7.3.	Gelchromatographie an Sephadex G50 fine	32
4.7.4.	Polyacrylamidgelelektrophorese	32
4.8.	Partielle Reinigung der Insulinabbauaktivität aus Rattenlebermikrosomen	33
4.8.1.	Präparation von Rattenlebermikrosomen	33
4.8.2.	Tritonextraktion von Rattenlebermikrosomen	34
4.8.3.	Chromatographie an Servachrom XAD-2	35
4.8.4.	Chromatographie an DEAE-Sephadex A50	36
4.9.	Molekulargewichtsbestimmung der Insulinabbauaktivitäten	37
4.9.1.	Gelfiltration an Sephacryl S300 Superfine	37
4.9.2.	SDS-PAGE	38
4.10.	Photoaffinitätsmarkierung der Insulinabbauaktivitäten	38
4.11.	Affinitätschromatographie	39
4.11.1.	Präparation von GSH-Sepharose	40
4.11.2.	Aktivierung mit 2,2'-Dipyridyl-Disulfid	40
4.11.3.	Prüfung der Gelbeladung an Glutathion	40
4.11.4.	Durchführung der Affinitätschromatographie	40
5.	ERGEBNISSE	42
5.1.	Allgemeines zu den Insulinabbauuntersuchungen	42
5.2.	Partielle Reinigung und Trennung der Insulinabbauaktivität aus Rattenlebermikrosomen	43
5.3.	Insulinabbauuntersuchungen der Aufarbeitungsstufen von Rattenlebermikrosomen	50
5.3.1.	TCA-Fällung und Radioimmunoassay	50
5.3.1.1.	Untersuchungen zur Aktivierung und Inhibierung der Abbauaktivitäten A, B1, B2 und C	50
5.3.1.2.	Vergleich der Insulinabbauaktivität von Aufarbeitungsstufen verschiedener Leberpräparationen	54
5.3.2.	Gelchromatographie von 125J-Insulin und 125J-Insulinabbauprodukten an Sephadex G50 fine	56
5.3.2.1.	Vergleich verschiedener 125J-Insuline	56
5.3.2.2.	Einfluß der Lagerung auf Lebermikrosomen und Lebermikrosomenextrakte	58
5.3.2.3.	Elutionsprofile nach Abbau von 125J-A14-Insulin durch Abbauaktivität aus Aufarbeitungsstufen der Lebermikrosomen	65
5.4.	SDS-PAGE von Lebermikrosomen und deren Aufarbeitungsstufen	76

Seite

5.5. Molekulargewichtsbestimmung der Insulinabbauaktivitäten A, B1, B2 und C mittels der Gelchromatographie 81

5.6. Photoaffinitätsmarkierung der Insulinabbauaktivitäten B1, B2 und C 86

5.7. PAGE zur Untersuchung von Insulin und Insulinbruchstücken nach Insulinabbau 90

5.7.1. Elektrophoretische Trennung verschiedener Insuline 90

5.7.2. Reaktion von Insulin mit Reduktionsmitteln und Insulinabbauinhibitoren 91

5.7.2.1. Reaktion von Insulin mit N-Ethylmaleimid und Glutathion 93

5.7.2.1.1. Reaktion von N-Ethylmaleimid mit Amino-Funktionen 98

5.7.2.1.2. Beeinflussung der Immunreaktivität des Insulins durch N-Ethylmaleimid und Glutathion 100

5.7.2.1.3. Reaktivität von N-Ethylmaleimid mit Insulin im sauren pH-Bereich 103

5.7.2.2. Untersuchung weiterer Abbauinhibitoren auf Wechselwirkungen mit Insulin 104

5.7.3. Insulinabbauuntersuchungen mittels PAGE 106

5.7.3.1. Insulinabbauuntersuchungen mit Lebermikrosomen, Lebermikrosomenextrakten und XAD-Eluat-Überständen 106

5.7.3.2. Elektrophorese der Insulinabbauprodukte nach Gelfiltration 110

5.7.3.3. Insulinabbauuntersuchungen an Plasmamembranen von Hepatozyten mittels PAGE 119

5.8. Affinitätschromatographie der Insulinabbauaktivitäten B1 und C 121

5.9. Präparative Elektrophorese der Insulinabbauaktivitäten B1 und C 124

6. DISKUSSION 129

6.1. Insulinabbau 129

6.2. Eigenschaften von Lebermikrosomen, Lebermikrosomenextrakten und XAD-Eluat-Überständen 131

6.3. Abbauaktivität A 134

6.4. Abbauaktivität B1 135

		Seite
6.5.	Abbauaktivität B2	139
6.6.	Abbauaktivität C	141
6.7.	Abbauaktivität in Plasmamembranen	143
6.8.	Reinheit und Reaktivität von Insulin	144
7.	ZUSAMMENFASSUNG	148
8.	LITERATURVERZEICHNIS	151

1. EINLEITUNG

Die biologische Wirkung von Hormonen wird durch einen spezifischen Rezeptor an den Zellen der Zielgewebe vermittelt. Für hydrophile Hormone wie Insulin, Glucagon oder Adrenalin sitzen die Rezeptoren an der Zelloberfläche, da die Hormone nicht direkt in die Zelle eindringen können. Lipophile Hormone wie die Steroide, die die Plasmamembranen passieren können, besitzen cytosolische Rezeptoren.

Die Wechselwirkung von Insulin mit dem Insulinrezeptor an der Zellmembran von Zielgeweben als erster Schritt der Insulinwirkung kann nach dem heutigen Stand der Forschung als gesichert angesehen werden. Die nachfolgende Kaskade von Stoffwechselreaktionen umfaßt eine Reihe bis heute noch kaum geklärter, miteinander verknüpfter, regulatorischer Vorgänge. Hierzu zählt auch der Abbau von Insulin im Zielgewebe.

Die ersten Untersuchungen am Insulinrezeptor (58) haben gezeigt, daß die Insulinbindung und der Insulinabbau von zwei verschiedenen Molekülen ausgehen müssen. Spätere Untersuchungen von Terris und Steiner (150, 151) an Leberzellen ergaben, daß nach Bindung von Insulin an die Zellmembranen das Insulin in die Zelle aufgenommen wird. Dort findet dann der Abbau statt. Die Bindung, Internalisierung und der anschließende Abbau von Insulin wurde von anderen Arbeitsgruppen (25, 60, 63, 70, 80) bestätigt.

Internalisiertes Insulin wurde an den verschiedensten Zellorganellen wie Lysosomen, Golgiapparat, Zellkern, Endoplasmatisches Retikulum und anderen zellulären Vesikeln (10, 11, 27 - 30, 42, 44, 45, 64, 65, 69, 70, 76, 83, 89, 91, 120, 131, 137, 143, 149, 166) über autoradiographische Methoden nachgewiesen. Solche Untersuchungen wurden an Leber- und

Fettzellen, IM-9-Lymphozyten, Fibroblasten oder 3T3-L1-Zellen durchgeführt. Der Mechanismus der Internalisierung wird durch "clustering" von Insulinrezeptoren eingeleitet. Die Rezeptoren sammeln sich in "coated pits", welche sich zu "coated vesicles" einstülpen, die den Transport in der Zelle übernehmen (54, 66, 71, 133). Da Insulin reversibel an den Insulinrezeptor gebunden ist, kann nach Internalisierung die Dissoziation des Insulins vom Rezeptor vor sich gehen. Ob das Insulin nach Dissoziation verändert oder noch intakt vorliegt,ist unbekannt. Ebenfalls ist noch nicht geklärt, welche Funktion Insulin oder Insulinfragmente innerhalb der Zelle besitzen und ob sie an biologischen Reaktionen beteiligt sind.

1.1. Zelluläre Insulinabbauwege

Über den Ort des Insulinabbaus ist man sich nicht einig. Es werden drei Abbauwege des Insulins beschrieben:

1. Lysosomaler Metabolismus
2. Disulfidspaltung (Plasmamembran, Mikrosomen)
3. proteolytischer Abbau (Cytosol,Mikrosomen)

Die Lysosomen sind dafür bekannt, daß sie endogenes und exogenes Material abbauen. Mit zwei verschiedene Techniken wurde der Insulinabbau in Lysosomen untersucht. Einerseits konnte über autoradiographische Verfahren radioaktiv markierter Insulinrezeptor an Lysosomen nachgewiesen werden, und zum anderen läßt sich an Zellen durch Gabe von lysosomotropen Agentien, wie Chloroquin oder NH_4Cl durch eine pH-Verschiebung zu höheren Werten der lysosomale Insulinabbau hemmen (28, 29, 61, 81, 120, 121, 123, 137, 149, 151). Dabei kommt es zur Akkumulation von intaktem Insulin in der Zelle. Allerdings wird von Chloroquin oder NH_4Cl nicht der gesamte zelluläre Insulinabbau gehemmt (76, 120 149, 155, 166). Von den verschiedenen Autoren sind Hemmungen zwischen 10 und 60 % angegeben. Andere Wirkungen von Chloroquin auf

zelluläre Systeme sind Hemmung der Proteinbiosynthese, Beeinflussung des Prostaglandinstoffwechsels,Erniedrigung des mitochondrialen Energiestoffwechsels,Hemmung der Pinocytose und Beeinflussung anderer Membran-Wechselwirkungen (49, 172). Diese Vielfalt von Wirkungen läßt Zweifel in Bezug auf die spezifische lysosomale Insulinabbauhemmung aufkommen.

Andere Autoren bezweifeln, daß es sich bei den vesikulären Strukturen, mit denen die "coated vesicles" verschmelzen, nur um Lysosomen handelt (11, 64, 137). Ozaki (131) bestätigt zwar den Transport von Insulin zu den Lysosomen, widerlegt aber den lysosomalen Insulinabbau folgendermaßen: Der Insulinrezeptor-Komplex wird über die Vesikel zu den Lysosomen transportiert. Nach Verschmelzung von Vesikel und Lysosom tritt eine pH-Verschiebung zu niedrigerem pH-Wert auf, durch die das Insulin vom Insulinrezeptor dissoziiert und ins Cytosol abgegeben wird. Hier kann das Insulin abgebaut werden oder über andere Mechanismen biologische Effekte auslösen. Da bei allen diesen Untersuchungen verschiedene zelluläre Systeme verwendet wurden, können natürlich unterschiedliche Mechanismen für die einzelnen Zellsysteme zutreffen. Die gesamten Ergebnisse sprechen allerdings eher für eine untergeordnete Rolle des lysosomalen Insulinabbaus (18, 49, 51).

Der zweite Abbauweg des Insulins, die reduktive Spaltung von Disulfidbrücken durch die Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (GIT), wurde lange Zeit als Primärschritt beim Insulinabbau angenommen (158, 159). Das Enzym GIT ist ubiquitär (97, 98, 134, 154, 164), spaltet eine große Anzahl von Verbindungen mit Disulfidbrücken und verwertet verschiedene Thiole (Glutathion, Dithioerythrit und Mercaptoethanol) als Co-Substrate (126). In der Literatur werden bisher zwei Enzyme beschrieben, die nomenklaturmäßig unter dem Namen Protein-Disulfid-Oxidoreduktase eingeordnet sind. Das eine Enzym ist als Protein-Disulfid-Isomerase bekannt und re-

aktiviert vollständig reduzierte RNAse (67), während es sich bei dem anderen Enzym um die oben genannte GIT handelt (160). Einige Autoren (3, 23, 126) schreiben beide Funktionen einem Enzym zu, während andere Autoren (77 - 80, 87) diese als zwei unterschiedliche Enzyme beschreiben. Nach Hillson (79, 80) sind es ebenfalls zwei unterschiedliche Enzyme. Die Isomerase soll allerdings GIT-Aktivität und die GIT soll Isomerase-Aktivität besitzen. Die Isomerase kommt vorwiegend mikrosomal vor (57), wurde aber auch im Cytosol gefunden (7). Die GIT kommt ebenfalls vorwiegend mikrosomal gebunden vor (35, 50). Sie wurde auch in Plasmamembranen nachgewiesen (162). Nach Wisher (170) stellt die in der Plasmamembran gefundene GIT eine mikrosomale Verunreinigung dar.

Die GIT wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen (7, 57, 97, 98, 108, 126, 134, 153, 154, 160) und auf ihre Eigenschaften untersucht. Sie ist durch SH-Blocker wie N-Ethylmaleimid (NEM) oder p-Chlormercuribenzoat hemmbar und benötigt freie SH-Funktionen zur Aktivierung. Ihr pH-Optimum liegt im Bereich von pH 7,5 und der K_M-Wert für Insulin ist mit 30 - 60 µM angegeben. Der isoelektrische Punkt liegt im Bereich von 4,1 - 4,6 und das Molekulargewicht wird von 37 000 - 92 000 angegeben. Die großen Differenzen sind teilweise auf die verschiedenen verwendeten Methoden zur Molekulargewichtsbestimmung zurückzuführen. Weiterhin werden niedrige (1,6 %), (163), bis hohe Kohlenhydratanteile von 8 - 12 % (23) gefunden. Diese sind sicherlich durch die verschiedenen Aufarbeitungsmethoden mit bedingt. Der unterschiedliche Kohlenhydrat-Anteil ist eine weitere Erklärung für die großen Differenzen der Molekulargewichte, die durch die SDS-PAGE und Gelfiltration bestimmt wurden.

Die bestehenden Differenzen der physikalischen Größen und Eigenschaften, die von den einzelnen Autoren beschrieben sind, lassen allerdings die Frage offen, ob es sich bei den beschriebenen Enzymen jeweils um differente Enzyme

(GIT oder Isomerase) handelt, oder um ein Enzym bei dem methodische Unterschiede ein solches Spektrum von Differenzen ergeben können. Da hier teilweise unterschiedliche Gewebe untersucht wurden, besteht auch die Möglichkeit, daß verschiedene Isoenzyme existieren.

Der dritte Insulinabbauweg stellt die proteolytische Spaltung von Insulin durch spezifische Proteasen dar. Als erstes wurde der proteolytische Insulinabbau von Mirsky beschrieben (16, 124, 125) und untersucht. Die von ihm gefundene Abbauaktivität wurde Insulinase genannt. Spätere Untersuchungen bestätigen das Vorkommen proteolytischer Abbauaktivitäten in Leber, Muskel und Niere. Es wurden hier sowohl cytosolische als auch membrangebundene Aktivitäten nachgewiesen (4, 5, 17, 19, 46, 52, 128, 171). Die beschriebenen Proteasen sind mit SH-Blockern wie NEM oder p-Chlormercuribenzoat hemmbar. Reagenzien wie GSH oder Dithioerythrit erhöhen die proteolytische Aktivität. Die Proteasen bauen allerdings auch ohne deren Anwesenheit Insulin ab. Der K_M-Wert der zum Teil gereinigten Enzyme liegt für Insulin im Bereich von 50 - 200 nM. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden an gereinigten Enzymen Untersuchungen durchgeführt, an welcher Stelle Insulin gespalten wird. Die beschriebenen Aktivitäten spalten Insulin zuerst in der B-Kette (5, 20, 49). Die von Duckworth beschriebene Protease (49) spaltet Insulin in der Position B16/17. Insgesamt treten allerdings bei allen Enzymen mehrere unterschiedliche Spaltstellen auf.

Der K_M-Wert der GIT bezüglich Insulin ist 100 - 1000-fach größer als die K_M-Werte, die für die Proteasen gefunden werden. Das wird von einigen Autoren als Grund für eine untergeordnete Rolle der GIT beim Insulinabbau angesehen. Zelluläre Untersuchungen zum Insulinabbau (12, 24, 68, 123 129, 131, 172) unterstützen ebenfalls die Theorie des proteolytischen Insulinabbaus. Die K_M-Werte des zellulären Insulinabbaus liegen bei 100 nM, entsprechend denen der Proteasen.

Der Insulinabbau an der Zelle soll rezeptorabhängig vor sich gehen. Das Insulin wird an den Rezeptor gebunden und in die Zelle transportiert. Dort findet die Dissoziation des Insulin-Rezeptor-Komplexes und der Insulinabbau statt. Es werden hoch- und niederaffine Insulinrezeptoren beschrieben, von denen der hochaffine mit niedriger Bindungskapazität für die biologische Wirkung und der niederaffine mit hoher Bindungskapazität, aufgrund verstärkter Insulin-Dissoziation, nach Internalisierung den Insulinabbau regulieren soll (24, 25, 132, 136). Der rezeptorunabhängige Insulinabbau wird an Membranen, Homogenaten oder sonstigen Zellextrakten gemessen. Hier findet der Transport von Insulin durch den Rezeptor in die Zelle nicht statt. Das Insulin ist für die Enzyme direkt zugänglich.

Für den Insulinabbau wird als allgemein gültig folgendes Schema angenommen:

> Nach Bindung von Insulin und Internalisierung des Insulin-Rezeptor-Komplexes soll der Komplex oder das abdissoziierte Insulin mit einer spezifischen Protease oder einem reduktiv spaltenden Enzym, die keinen Bestandteil des Insulinrezeptors darstellen, in Wechselwirkung treten. Durch diese Spaltung wird das Insulin für weitere Proteasen zugänglich gemacht (49, 51, 166).

Da der gesamte Insulinabbau intrazellulär abläuft, können sämtliche intrazellulären Enzyme wie GIT, cytosolische sowie membrangebundene Insulin-Proteasen und auch andere Proteasen, die für den Folgeabbau verantwortlich sein sollen, am Insulinabbau beteiligt sein. Die Frage des Primärschrittes im Insulinabbauvorgang schreiben die meisten Autoren der jeweils von ihnen nachgewiesenen Abbauaktivität zu. Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht bekannt.

1.2. Abhängigkeit von Insulinabbau und Insulinwirkung

Auch die Abhängigkeit von Insulinwirkung und Insulinabbau ist nicht geklärt. Es werden unter anderem zwei mögliche Beziehungen in Betracht gezogen:

A) Der Insulinabbau dient zur Terminierung der Insulinwirkung.
B) Durch intrazelluläres Insulin oder Insulinabbaubruchstücke werden biologische Wirkungen induziert.

Es konnte gezeigt werden, daß Insulinrezeptor-Antikörper, Pflanzenlectine wie Concanavalin A, Trypsin oder andere Substanzen die biologische Wirkung von Insulin auslösen können (8, 56, 90, 96, 99, 101-104, 118, 142, 144, 156, 157, 174). Dies spricht für die biologische Wirkung des Insulinrezeptors und nicht des Liganden.

Die Insulinwirkung wird bei solchen Vorgängen durch die Freisetzung von Mediatoren erklärt (26, 92, 110, 141, 173). Es handelt sich hier um Glycoproteine, Lipoproteine, Peptide oder Phospholipide, die durch die Wechselwirkung von diesen mimetischen Agenzien mit dem Insulinrezeptor, aus der Membran freigesetzt werden. Insulin selbst kann ebenfalls solche Mediatoren freisetzen.

Durch diesen Mechanismus kann nur ein Teil der Insulinwirkung induziert werden. Es müssen also noch andere Mechanismen existieren, die eine Insulinwirkung auslösen. Diese können durch die Internalisierung von Insulin vermittelt oder ausgelöst werden. Ob zur Freisetzung von Mediatoren die Internalisierung des Insulinrezeptors notwendig ist, geht aus diesen Ergebnissen nicht hervor.

Sowohl die Termination des Insulinsignals, als auch die intrazelluläre Wirkung von Insulin oder Insulinabbauprodukten bedingt eine Internalisierung des Insulins. Verschiedene Autoren (28, 81, 111, 150, 165) sprechen für eine Ter-

mination durch Insulinabbau. Diese spielt sicherlich eine Rolle bei der Regulierung der Insulinwirkung. Das Vorkommen von Insulinrezeptoren in verschiedenen Zellkompartimenten spricht aber auch für die Möglichkeit der Insulinwirkung an diesen Orten (73, 84, 138, 167). Ob der Insulinrezeptor dabei als Transportsystem für Insulin zu den Zellkompartimenten dient und durch Freisetzung von Insulin eine spezifische Insulinwirkung ausgelöst wird, ist ungeklärt.

Auch die von Steiner (148) vorgeschlagene Signalvermittlung von Insulinfragmenten ist bisher nicht wiederlegt. Durch Proteinasen oder reduktiv spaltende Enzyme können Insulinbruchstücke gebildet werden, die ähnlich den Mediatoren Insulinwirkung auslösen.

Die Untersuchungen von Insulinwirkung und Insulinabbau dehnen sich auf sehr viele Gewebe sowie Zellsysteme aus. Hierbei wird die Frage, ob es sich um Zielgewebe handelt, oft außer acht gelassen. Zelluläre Systeme wie Erythrozyten oder Lymphozyten sind gut zu gewinnen und zu handhaben. Es besteht allerdings die Frage, ob sie als Demonstrationsobjekt für Internalisierungs-, Wirkungs- und Abbaustudien geeignet sind, da sie kein Zielgewebe für Insulin darstellen. Leber, Muskel und Fettgewebe können als Zielgewebe angesehen werden, während die Niere wahrscheinlich nur eine "Clearence-Funktion" für Insulin besitzt. Die Leber wird bis heute als Hauptzielort für Insulinwirkung und Insulinabbau angesehen. Unter normalen Bedingungen wird das vom Pankreas abgegebene Insulin über die Leber zur Peripherie transportiert. Bis zu 50 % des vorhandenen Insulins werden bei der ersten Passage von der Leber aufgenommen (21, 95, 119, 122, 130, 140). Sie soll als Regulationsorgang für die periphere Insulinkonzentration dienen und ist außerdem für die Insulinbeseitigung zuständig.

1.3. Aufgabenstellung

Aufgabe dieser Arbeit ist es, die membrangebundenen Insulinabbauaktivitäten aus Rattenleber zu untersuchen. Es wurde die Trennung, Reinigung und Identifzierung von Insulinabbauaktivitäten aus Lebermikrosomen durchgeführt und die Insulinabbauprodukte untersucht. Die Identifizierung der membrangebundenen Insulinabbauaktivitäten dient zur Klärung der Beteiligung von proteolytisch oder reduktiv spaltenden Enzymen am Insulinabbauvorgang.

Aus folgenden Gründen wurden Lebermikrosomen als Untersuchungsmaterial verwendet:

A) Die Leber dient als Zielorgan für Insulin und besitzt, wie oben erwähnt, die Eigenschaft des Insulinabbaus.

B) Mirkosomen sind heterogene Membranen, die Plasmamembranen, Golgiapparat, Endoplasmatisches Retikulum und andere vesikuläre Membranbestandteile beinhalten. Dadurch wird der Nachweis aller membrangebundenen Insulinabbauaktivitäten möglich.

Zum Nachweis von Insulinabbau wurden die Lebermikrosomen sowie deren Aufarbeitungsstufen während der Trennung und Reinigung der Insulinabbauaktivitäten mittels vier verschiedener Testmethoden unter variierenden Bedingungen ausgetestet. Die in dieser Arbeit verwendeten Testmethoden zur Untersuchung der Insulinabbauprodukte sind:

TCA-Fällung, Radioimmunoassay, Gelchromatographie an Sephadex G50 fine und die Polyacrylamidgelelektroporese nach Davis.

Die Verwendung mehrerer Testmethoden mit unterschiedlicher Empfindlichkeit und differenter Aussage über den Insulinabbau erhöht die Wahrscheinlichkeit der Detektion aller vorkommenden Insulinabbauaktivitäten.

2. ABKÜRZUNGEN UND SCHREIBWEISEN

ADH	Alkoholdehydrogenase
AS	Aminosäure
Bac	Bacitracin
Bis	N,N'-Methylenbisacrylamid
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	Impulse pro Minute
CT	Chloramin T
DCPIP	2,6-Dichlorphenol-Indophenol
DTE	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz
GIT	Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (E.C. 1.8.4.2.)
GSH	Glutathion reduziert
GSSG	Glutathion oxidiert
HAc	Essigsäure
IP	Isoelektrischer Punkt
KNaPP	Kalium-Natrium-Phosphatpuffer
LM	Lebermikrosomen
LME	Lebermikrosomenextrakt
MABI	$N^{\epsilon B29}$-Mono(4-azidobenzoyl)Insulin
MG	Molekulargewicht
MSH	Mercaptoethanol
NEM	N-Ethylmaleimid
o-Phe	1,10-Phenanthroliniumchlorid (Monohydrat)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p-CMB	P-Chlormercuribenzoesäure-Natrium-Salz
PEG	Polyethylenglykol
PM	Plasmamembran
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylenethylendiamin

Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan	
Triton	Triton X-100	
XADE	Servachrom XAD-2 Eluat	4.8.3.
XADEP	Servachrom XAD-2 Eluat Pellet	4.8.3.
XADEÜ	Servachrom XAD-2 Eluat Überstand	4.8.3.

CT-125J-Insulin	Chloramin T jodiertes Insulin
125J-A14-Insulin	Monokomponentes Mono-^{125}J-(Tyr^{A14})-Insulin
125J-MABI	Chloramin T jodiertes N$^{\epsilon B29}$-Mono-(4-azidobenzoyl)Insulin

Alle Prozentangaben in dieser Arbeit sind als % (w/v) zu verstehen.

Schreibweise von Puffern:

0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton

Der Puffer enthält 0,03 % Triton und wurde mit HCl auf pH 7,4 eingestellt.

3. M A T E R I A L

3.1. Chemikalien

Acrylamid	BDH, Poole (GB)
Alkoholdehydrogenase	Boehringer, Mannheim
Aldolase aus Kaninchenmuskel	Boehringer, Mannheim
Anti-Rinderinsulin-Antiserum (Guinea Pig)	Miles, Frankfurt
Anti-Schweineinsulin-Antiserum (Guinea Pig)	Miles, Frankfurt
Bacitracin	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
ß-Chymotrypsin	Sigma, München
Chloramin T	Serva, Heidelberg
Collagenase Typ I	Sigma, München
Coomassie Brillant Blue	Sigma, München
2,6-Dichlorphenol-Indophenol	Sigma, München
5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)	Fluka, Neu-Ulm
2,2'-Dipyridyl-Disulfid	Fluka, Neu-Ulm
Dithioerythrit	Serva, Heidelberg
EDTA	Serva, Heidelberg
ß-Galactosidase aus E. coli	Sigma, München
ɣ-Globulin aus Rinderserum (ca. 98 %)	Serva, Heidelberg
Glutathion reduziert	Sigma, München
Glycin p.A.	Serva, Heidelberg
Hemoglobin Typ XVI	Sigma, München
Katalase aus Rinderleber	Boehringer, Mannheim
Mercaptoethanol	Bayer, Leverkusen
Lactoperoxidase (E.C. 1.11.1.7)	Sigma, München
Leucin-Aminopeptidase (Catepsin D, L9876)	Sigma, München
N,N'-Methylenbisacrylamid (vor Gebrauch aus Aceton umkristallisiert)	BDH, Pool (GB)
$Na^{125}J$	Amersham-Buchler, Braunschweig

N-Ethylmaleimid	Serva, Heidelberg
Ovalbumin	Fluka, Neu-Ulm
p-Chlormercuribenzoesäure-Na-Salz	Serva, Heidelberg
PEG Typ 6000	Serva, Heidelberg
Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid	Serva, Heidelberg
Phosphorylase b aus Kaninchenmuskel	Sigma, München
Rinderserumalbumin Fraktion V (96-99 %, A8022)	Sigma, München
Rinderserumalbumin Fraktion V, RIA-grade (speziell gereinigt für Insulin-RIA) A7888	Sigma, München
Röntgenentwickler und -fixiersalz	Adefo, Nürnberg
TEMED	Serva, Heidelberg
Thyroglobulin	Pharmacia Fine Chemicals Upsala (S)
Tris	Sigma, München
TRISMA BASE	Sigma, München
TRISMA preset pH 8,7	Sigma, München
Triton X-100 p.A.	Serva, Heidelberg
Trasylol (Aprotinin) 100000 KIE	Bayer, Leverkusen
Trypsin Typ III aus Rinderpankreas	Sigma, München
Gelmaterialien	
CNBr-aktivierte Sepharose 4B	
DEAE-Sephadex A50	
QAE-Sephadex C25	
SP-Sephadex C25	
Sephacryl S300	Pharmacia Fine Chemicals Upsala (S)
Servachrom XAD-2	Serva, Heidelberg

Rinderinsulin war ein Geschenk der Fa. Hoechst, Frankfurt. Monokomponentes Rinderinsulin und Monokomponentes Schweineinsulin waren ein Geschenk von der Fa. Novo, Kopenhagen, Dänemark.
Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Fa. Merck,Darmstadt, bezogen.

3.2. Verbrauchsmaterial

Chromatographiepapier 3mm	Whatman, Maidstone (GB)
Decon 90	BDH, Poole, (GB)
Polystyrolreagenzgläser 11 x 70mm, 12 x 75 mm, 16 x 100 mm	Greiner, Nürtingen
Röntgenfilm Kodak X-O-MAT AR (XAR-5) 20 x 25 cm	Eastman Kodak Comp., Rochester, N.Y. (USA)

3.3. Geräte

Zentrifugen:

Kühlzentrifuge G50K mit Rotor 6 x 250 und 8 x 35	WKF
Minifuge II mit Tragringrotor 3350	Heraeus-Christ, Osterode
Servall "Automativ Super-speed" mit Rotor SS 34	Hormuth-Vetter, Heidelberg-Wiesloch
Beckmann L5-65 mit Rotor Ti 75 und Ti 45	Beckmann, München

Gammacounter:

Kontron MR 480 TP	Kontron, München
Auto Gamma Scintillation Spectrometer 5230	Packard, Frankfurt

Fraktionssammler:

Ultrorac LKB 7000	LKB, Bromma (S)
Multirac LKB 2111	LKB, Bromma (S)

Elektrophoresegeräte:

Stromversorgung Vokam 2541 und Vokam SAE 2761	Shandon, London (GB)
Power Supply LKB 2197	LKB, Bromma (S)
Power Supply LKB 2002	LKB, Bromma (S)
Elektrophoresekammer "Protean Dual Vertical Slab" (32 cm)	Biorad, München
2001 Vertikal-Elektrophorese LKB	LKB, Bromma (S)
Elektrophoresekammer Eigenbau	Institutswerkstatt

Aldo-Xer Geltrockner	Schütt, Göttingen
Geltrockner LKB 2003	LKB, Bromma (S)
UV-Lampen:	
Philips HPK 125 W	Philips, Hamburg
UVIS 254/366 nm	Desaga, Heidelberg
Gefrierschrank VF 85-300 S	Colora, Lorch
Photometer M4 Q II mit PM Q II	Zeiss, Oberkochen
Digital pH-Meter	Bachofer, Reutlingen
Homogenisator Potter S mit Teflonkolben	Braun, Melsungen
Dounce-Homogenisator mit Kolben L	Braun, Melsungen
Braun Thermomix 1441	Braun, Melsungen
Röntgenverstärkerfolien:	
Chronex Hi-Plus und Par Speed	Du Pont de Nemours, Frankfurt
Titan 2 U	Siemens, Erlangen

4. M E T H O D E N

4.1. Reinigung von Insulin nach (106)

Rinderinsulin wurde in Ammoniumacetat-Puffer pH 7,6 gelöst und nach Zugabe von 1 mM EDTA Na_2 gegen H_2O dialysiert und lyophilisiert. 250 mg des entzinkten Insulins wurden anschließend auf eine Säule (Sephadex G50 fine, 4 x 100 cm) aufgetragen und mit 1 M Essigsäure eluiert. Das gereinigte Insulin wurde nach Lyophilisation bei 4° C gelagert.

4.2. Präparation von 125J-Insulin

Zur Jodierung von Insulin wurden zwei Methoden angewandt. Entzinktes Rinderinsulin wurde nach Hunter und Greenwood (86) modifiziert nach (38, 106) mit Chloramin T jodiert. Monokomponentes Schweine- oder Rinderinsulin wurden mit Lactoperoxidase nach Jørgensen und Larsen (94) modifiziert nach (100) jodiert.

4.2.1. Jodierung mit Chloramin T

Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. In ein Plastikreagenzglas (12 x 75 mm) wurden pipettiert:

10 µl Na125J (≙ 1 mCi ≙ $3,7 \times 10^7$ Bc)
+ 100 µl 0,1 M KNaPP pH 7,4
+ 10 µl gereinigtes Rinderinsulin in 0,1 M KNaPP pH 7,4 (0,4 mg/ml)
+ 20 µl Chloramin T in H_2O (1 mg/ml)
40 sec. unter Rühren (Vortex) reagieren lassen, dann
+ 20 µl $Na_2S_2O_5$ in H_2O (3 mg/ml)
vortexen und sofort
+ 10 µl 0,1 M KNaPP pH 7,4/2,0 % Triton/5,0 % BSA (RIA-grade)
vortexen.

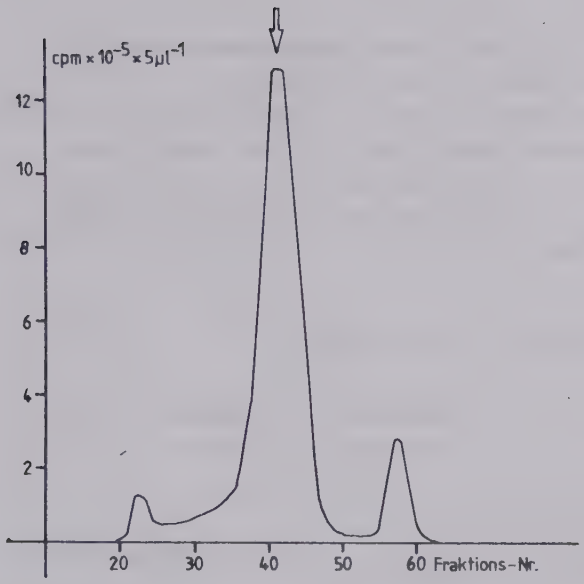


Abbildung 1: Gelchromatographie von 125J-Insulin nach Chloramin T-Jodierung an Sephadex G 50 fine

= 125J-Insulin

Vor der Trennung des Reaktionsgemisches wurde mittels TCA-Fällung die 125J-Einbaurate bestimmt. Sie sollte mindestens 80 % betragen.
Dann wurden die 170 µl Reaktionsgemisch mittels Gelfiltration getrennt.

Säule/-material:	1,3 x 50 cm/Sephadex G50 fine
Elutionspuffer:	0,1 M KNaPP pH 7,4/0,1 % Triton
Elutionsgeschwindigkeit:	12 - 15 ml/h
Fraktionsvolumen:	0,9 - 1,0 ml
Elutionstemperatur:	+ 4° C

Die Spitzenfraktionen des 125J-Insulinpeaks wurden mit 20 µl 5 % BSA (RIA-grade) in 0,1 M KNaPP pH 7,4 versetzt und bei - 30° C aufbewahrt.
Abbildung 1 zeigt ein typisches Elutionsdiagramm nach Jodierung mit Chloramin T.

Der 125J-Einbau, d. h. der Anteil des eingesetzten $125J^-$, der in Protein eingebaut wurde, betrug 80 - 90 %. Die spezifische Aktivität des 125J-Insulins lag bei 210 - 250 µCi/µg Insulin, entsprechend einem Gehalt von durchschnittlich 0,9 Atomen 125J pro Insulinmolekül. Weniger als 1 % der Radioaktivität in den Fraktionen des 125J-Insulinpeaks war löslich in 5 % TCA.

4.2.2. Jodierung mit Lactoperoxidase

Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur durchgeführt. In ein Plastikreagenzglas (12 x 75 mm) wurden pipettiert:

30 µl Na125J (≙ 3 mCi ≙ 1,1 x 10^8 Bc)
\+ 25 µl 0,4 M KNaPP pH 7,2
\+ 25 µl monokomponentes Rinder- oder Schweineinsulin (40 mg/ml in 0,04 M HCl)
\+ 10 µl H_2O_2 (0,32 mM in H_2O)
\+ 10 µl Lactoperoxidase (7,7 U/ml in H_2O)
60 sec. unter Rühren (Vortex) reagieren lassen, dann
\+ 100 µl EDTA Na_2 (10 mM in H_2O)
\+ 1 ml Lysinpuffer*/1,0 % BSA (reinst)
vortexen.

* Lysinpuffer = 0,22 M Lysin-Hydrochlorid mit NaOH auf pH 9,4 eingestellt.

Die Lösungen des monokomponenten Insulins und der Lactoperoxidase wurden unmittelbar vor der Jodierung angesetzt.
Vor der Reinigung des Reaktionsgemisches wurde mittels TCA-Fällung die 125J-Einbaurate bestimmt. Sie sollte mindestens 80 % betragen.
Dann wurde das Reaktionsgemisch durch Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt.

Säule/-material:	1 x 25 cm/ QAE-Sephadex A25, mit mindestens 300 ml Elutionspuffer äquilibriert
Elutionspuffer:	Lysinpuffer*/1,0 % BSA (reinst)/ 0,002 % Chlorhexidin

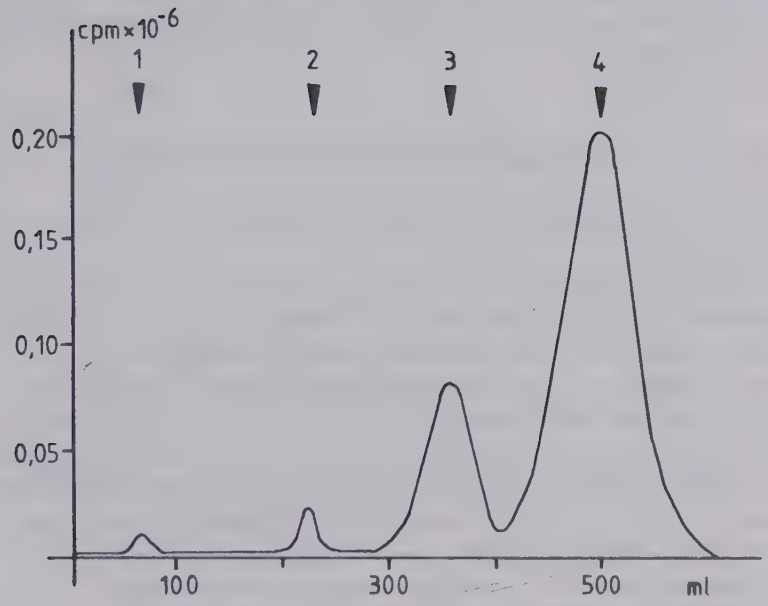


Abbildung 2: Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie einer Jodierung nach der Lactoperoxidase-Methode

1 = Ausschlußvolumen
2 = $^{125}J^-$
3 = Mono-^{125}J-(Tyr-A19)Insulin
4 = Mono ^{125}J-(Tyr-A14)Insulin

Elutionsgeschwindigkeit: 10,5 ml/h
Fraktionsvolumen: 6 ml
Elutionstemperatur: + 20° C

Die Fraktionen wurden bei + 4° C gesammelt. Die Abbildung 2 zeigt das Elutionsdiagramm der Anionenaustauschchromatographie einer typischen Lactoperoxidasejodierung. Peak 3 besteht zu 92 % aus Mono-^{125}J-(Tyr^{A19})Insulin, Peak 4 besteht zu 97 % aus Mono-^{125}J-(Tyr^{A14})Insulin (100). Die Spitzenfraktionen des Peaks 4 wurden vereinigt und bei - 30° C gelagert. Die spezifische Aktivität des Mono-^{125}J-(Tyr^{A14})Insulins beträgt ca. 160 - 200 µCi/µg Insulin. Der Grund hierfür

ist eine geringe Überlappung des eluierten nat. Insulinpeaks mit Peak 4. Weniger als 1 % der Radioaktivität in den Fraktionen des Mono-^{125}J-(Tyr^{A14})Insulins war löslich in 5 % TCA.

4.3. Präparation von 125J-MABI nach (105)

Die Präparation und Lagerung aller Produkte erfolgte im Dunkeln.
27 mg gereinigtes Rinderinsulin wurden in 2,2 ml Dimethylformamid und 10 µl Triäthylamin gelöst und 3,6 mg N-Hydroxysuccinimidester der 4-Azidobenzoesäure (synthetisiert nach 59), in 400 µl Dimethylfomamid gelöst, zugegeben. Nach 5 h Rühren bei Raumtemperatur wurde mit 5 ml 1 N Essigsäure versetzt. Der pH-Wert wurde mit 1 N NH_3 auf etwa 5,4 eingestellt, wobei das Reaktionsprodukt ausfiel. Das Präzipitat wurde 3 h bei + 2° C stehengelassen, abzentrifugiert und mit 2 ml eiskaltem Aceton gewaschen. Das Rohprodukt wurde über Kationenaustauschchromatographie aufgetrennt:

Säule/-material:	2 x 40 cm/SP-Sephadex C25
Elutionspuffer:	1,5 M Essigsäure/6 M Harnstoff/ 0,02 M NaCl
Gradient:	Linear, 0,02 M NaCl - 0,4 M NaCl Gesamtvolumen 800 ml.
Elutionsgeschwindigkeit:	15 ml/h
Fraktionsvolumen:	4 ml
Elutionstemperatur:	+ 4° C

MABI eluiert als vierter Peak, bei 3,0 M NaCl (Abb. 3). Die Fraktionen des MABI-Peaks wurden vereinigt und bei + 4° C erst gegen 0,02 M Na-Acetat, dann gegen Wasser dialysiert, wobei das Produkt ausfiel.Die Suspension wurde lyophilisiert und mittels Gelfiltration gereinigt:

Säule/-material:	1,1 x 50 cm/Sephadex G50 fine
Elutionspuffer:	1 M Essigsäure
Elutionsgeschwindigkeit:	14 ml/h
Elutionsvolumen:	2 ml
Elutionstemperatur:	+ 4° C

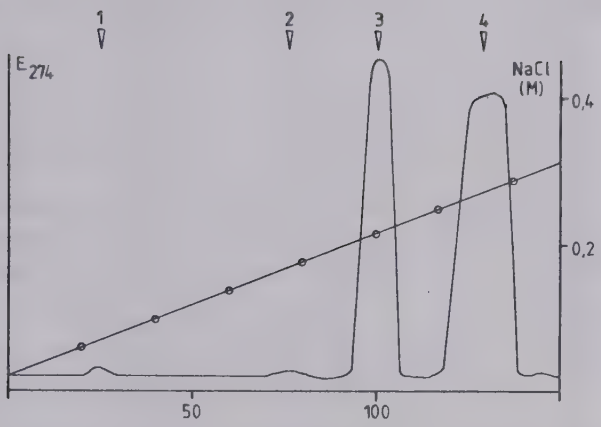


Abbildung 3: Trennung verschiedener Azidobenzoylinsuline über SP-Sephadex C25. Das Hauptprodukt MABI eluiert als Peak 4.

——— = Elutionsprofil
-o-o- = NaCl-Gradient

Die Fraktionen des MABI-Peaks wurden vereinigt und lyophilisiert.
Die Jodierung von MABI erfolgte nach der Chloramin T Jodierungsvorschrift (Kap. 4.2.1.). Abweichend hierzu muß im Dunkeln gearbeitet werden. Die 125J-MABI-Spitzenfraktionen wurden ohne Zusatz von Albumin bei - 30° C gelagert. Die spezifische Aktivität von 125J-MABI lag bei 200 - 250 µCi/µg MABI. Weniger als 1 % der 125J-MABI-Fraktionen war löslich in 5 % TCA.

4.4. Präparation von Dansylinsulin oder Dansylaminosäuren

Die Dansylierung von Rinderinsulin oder Aminosäuren wurde nach Gray (34,74) durchgeführt.
In ein Plastikreagenzglas (12 x 75 mm) wurden pipettiert:

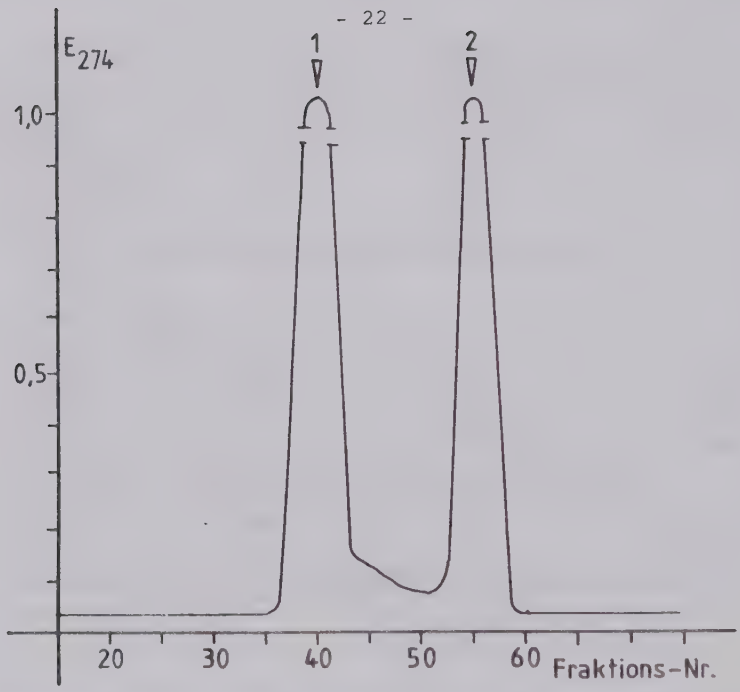


Abbildung 4: Elutionsprofil von Dansylinsulin an Sephadex G50 fine.

1 = Dansylinsulin
2 = Dansyl-OH

1200 µl 0,05 M NaPP, pH 8,2
+ 400 µl Rinderinsulin (1,75 mM) in 0,05 M NaPP, pH 8,2
oder einer entsprechenden Aminosäurelösung (1,75 mM)
+ 400 µl Dansylchlorid (3,7 mM) in Aceton p.A.
vortexen und 3 h bei 37° C inkubieren,
+ 1000 µl Essigsäure 1 M
vortexen.

Das Reaktionsgemisch wurde mittels Gelfiltration getrennt:

Säule/-material:	2,2 x 100 cm/Sephadex G50 fine
Elutionspuffer:	1 M Essigsäure
Elutionsgeschwindigkeit:	12 - 15 ml/h
Fraktionsvolumen	4 ml
Elutionstemperatur:	Raumtemperatur

Die Spitzenfraktionen des Dansylinsulin-Peaks wurden vereinigt, lyophilisiert und bei + 4° C aufbewahrt. Abbildung 4 zeigt das Elutionsdiagramm von Dansylinsulin an Sephadex G50 fine.

4.5. Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach Lowry et. al (117), in der Durchführug wurde nach Richterich (139) verfahren.
Folin Gebrauchslösung:

1 ml 1 % $CuSO_4$ x 5 H_2O in H_2O
\+ 1 ml 2 % Kalium-Natrium-Tartrat in H_2O
\+ 98 ml 2 % $NaCO_3$ in H_2O

Phenolreagenz:
Die Normalität des Phenolreagenz (Folin-Ciocalteau, Fa. Merck, Darmstadt) wurde durch Titration mit 0,1 N NaOH gegen Phenolphthalein bestimmt und auf 1 N eingestellt.

100 µl Probe wurden bei Raumtemperatur mit 2 ml Folin Gebrauchslösung versetzt und gerührt (Vortex). Nach 10 min. wurden 200 µl Phenolreagenz zugegeben, gerührt und nach 30 - 40 min. die Extinktion bei 578 nm gemessen. Als Standard diente 0,1 % Albumin.
Proben die störende Agenzien enthielten, wurden mit TCA vorbehandelt:
100 µl Probe wurden mit 60 µl 20 % TCA (in H_2O) versetzt, gerührt (Vortex) und nach 5 min. Stehen 15 min. bei 5500 U/min (Minifuge II, Tragringrotor, Heraeus Christ) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 100 µl 0,1 N NaOH gelöst und wie oben weiter verfahren.

4.6. Elektrophoresemethoden

4.6.1. Analytische Elektrophoresemethoden

Die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (109) und die diskontinuierliche Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Davis (39) wurden durchgeführt.
Die SDS-PAGE trennt Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Sie wurde zum Nachweis der Proteinmuster verschiedener Anreicherungsstufen der Insulinabbauaktivitäten und zur Molekulargewichtsbestimmung verwendet.
Die PAGE trennt Proteine nach ihrer Ladung und Größe. Sie wurde zur Prüfung der Reinheit verschiedener Insuline und als Nachweis von Insulinfragmenten, die durch Einwirkung von Insulinabbauaktivitäten auf Insulin entstanden, verwendet.
Die für die Elektrophoresen verwendeten Glasplatten wurden mit 5 % Decon 90 gereinigt.
Bei beiden Elektrophoresemethoden wurden die Proben und die Gele nach gleichem Verfahren mit den Lösungen aus Tabelle 1 A oder B hergestellt.

4.6.1.1. Durchführung der Elektophoresen

Es wurden homogene Gele oder Gradientengele (SDS-PAGE oder PAGE) der Größe 140 x 120 x 1,5 mm hergestellt. Für homogene Gele wurden Trenngelpuffer und Acrylamid/Bisacrylamid-Lösungen zusammengegeben, einschließlich des Polymerisationszusatzes mit H_2O auf 28 ml eingestellt (Lösungen siehe Tabelle 1) und polymerisiert. Für Gradientengele wurden jeweils 14 ml Trenngel-Lösung entsprechender Acrylamid/Bisacrylamid-Konzentration hergestellt. Zum Gießen der Gele wurde ein Gradientenmischer verwendet. Die Sammelgele wurden immer mit 4 % Acrylamid/0,107 % Bisacrylamid hergestellt

A) SDS-PAGE

Konz. der Stammlösung in H_2O			Konz. im Gel	
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung			für homogene oder Gradientengele, wie jeweils im Ergebnisteil angegeben (4-29 % möglich)	
Acrylamid	40,0	%		
Bisacrylamid	1,07	%		
Trenngelpuffer				
TRIZMA preset pH 8,7	1,5	M	0,375	M
SDS	0,4	%	0,1	%
Sammelgelpuffer				
TRIZMA BASE/HCl pH 6,8	0,5	M	0,125	M
SDS	0,4	%	0,1	%
Polymerisationszusatz				
Ammoniumpersulfat	10,0	%	0,075	%
TEMED		konz.	0,04	%
Probenpuffer			Konz. in der Probe	
Glycerin	20,0	%	10,0	%
SDS	10,0	%	5,0	%
TRIZMA BASE/HCl pH 6,8	0,125	M	0,0625	M
EDTA pH 6,8	1,0	mM	0,5	mM
Bromphenolblau	0,002	%	0,001	%
Elektrodenpuffer				
TRIZMA BASE	0,025	M		
Glycin	0,192	M		
SDS	0,1	%		

B) PAGE

Alle Stammlösungen entsprechen denen des Laemmli-Systems (SDS-PAGE). Dem Trenngelpuffer, Sammelgelpuffer, Probenpuffer und Elektrodenpuffer wurde jedoch kein SDS zugesetzt. Das Verhältnis Acrylamid zu Bisacrylamid ist bei beiden Systemen immer 100 : 2,68

Tabelle 1 A/B: Lösungen für die Elektrophoresesysteme.

und waren 20 mm hoch. Die Probenvorbereitung war für beide Verfahren gleich. Die Proben wurden mit Probenpuffer (Tab. 1 A oder B) versetzt. Das maximale Auftragvolumen betrug 100 µl pro Tasche, die maximale Proteinmenge 100 µg pro Tasche. Zur Reduktion von Proben wurde DTE zugegeben, sodaß eine Endkonzentration von 100 mM erreicht wurde. Proben für die SDS-PAGE wurden immer 2 min. bei 100° C behandelt. Die Proben wurden durch Unterschichten von Elektrodenpuffer auf die Gele aufgetragen.
Alle Elektrophoresen wurden bei konstanter Stromstärke (35 mA/Gel) durchgeführt und wurden beendet, wenn sich die Bromphenolblaubande 1,5 cm vor dem Gelende befand.

4.6.1.2. Färbung und Trocknung von Gelen

Färbelösungen:

A) 0,025 % Coomassie Blue/25 % Isopropanol/10 % HAc in Wasser

B) 0,025 % Coomassie Blue/40 % Methanol/4 % Formaldehyd in Wasser

Entfärbelösung:

10 % HAc/10 % Methanol in Wasser

Gele mit hochmolekularen Proteinen (MG größer 10 000) wurden mit Färbelösung A, Gele mit niedermolekularen Peptiden (MG kleiner 10 000) wurden mit Färbelösung B über Nacht unter Schütteln angefärbt. Die Entfärbung erfolgte unter Schütteln in Entfärbelösung. Die Entfärbelösung wurde mehrmals gewechselt.
Zur Dokumentation wurden gefärbte oder ungefärbte Gele getrocknet oder photographiert. Die Trocknung erfolgte mit den im Kap. 3.3. angegebenen Geltrocknern, 3 h bei 90° C im Wasserstrahlvakuum.

4.6.1.3. Autoradiographie von Gelen

Zur Autoradiographie von Gelen wurden ungefärbte und getrocknete, oder gefärbte und getrocknete Gele verwendet. Die Autoradiographie erfolgte mit KODAK X-OMAT-AR Film (20 x 25 cm) und denen in Kap. 3.3. angegebenen Verstärkerfolien. Die Belichtung der Filme wurde 3 - 25 Tage in Röntgenkassetten bei - 30° C oder - 80° C durchgeführt. Die Filme wurden nach Vorschrift des Herstellers mittels Aldefo Röntgen-Rapid-Entwickler und Aldefo Röntgen-Rapid-Fixierer entwickelt und fixiert.
Die Länge der Belichtung richtet sich nach der aufgetragenen Menge an Radioaktivität. Die Belichtung des Films durch eine Radioaktivitätsbande mit ca. 1000 cpm dauert mit Verstärkerfolie drei Tage bei - 80° C.

4.6.2. Präparative Elektrophorese

Für die präparative Elektrophorese wurde das Verfahren der nativen diskontinuierlichen PAGE verwendet. Es können hierfür alle Lösungen, wie in Tabelle 1 B aufgeführt, verwendet werden.

4.6.2.1. Gelherstellung

Es wurden Gele der Größe 140 x 140 x 3,5 mm gegossen.

Gel:			
Unterschichtungsgel (UG)	20 % Acrylamid	40 mm hoch
Trenngel (TG)	5 oder 7 % Acrylamid	80 mm hoch
Sammelgel (SG)	4 % Acrylamid	20 mm hoch

Das UG wurde gegossen und polymerisiert. Auf das UG wurde ein Glasfritenvierkant (3,5 x 3,5 x 140 mm) gelegt. In Höhe des Glasfritenvierkant sind die Gelabstandshalter durchbohrt (1,5 mm Ø). Mit Glycerin (50 % in H_2O) wurde der Glasfritenvierkant ca. 2 mm hoch überschichtet und darüber das

TG polymerisiert. Auf das TG wurde das SG polymerisiert, welches eine Tasche von 120 x 10 x 3,5 mm besitzt. Die durchbohrten Gelabstandshalter sind mit einem Schlauchanschluß versehen. Der eine Ausgang des Abstandhalters wurde an ein Puffer-Vorratsgefäß angeschlossen, der andere Ausgang an einen Fraktionssammler mit dazwischen geschalteter Schlauchpumpe. Die Elution von Puffer durch den Glasfritenvierkant sollte nur saugend durchgeführt werden. Der Druck des Elutionspuffers auf das Gel sollte die Größe des Drucks, der durch die Füllhöhe des oberen Puffertanks festgelegt ist, nicht überschreiten. Man kann dies durch eine zwischengeschaltete Druckausgleichsvorrichtung nach dem Elutionspuffergefäß erreichen.

4.6.2.2. Probenvorbereitung

Die aufzutragenden Proben sollten salzfrei sein und wurden durch Unterschichten von Elektrodenpuffer aufgetragen. Die nach Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A50 gewonnenen Spitzenfraktionen der Insulinabbauaktivitäten B1 und C, wurden 2 x 5 h gegen 0,01 M NH_4HCO_3 pH 7,4 und 1 x 12 h gegen Wasser dialysiert und anschließend lyophilisiert. 5 - 7 mg Protein wurden in Probenpuffer (2 ml Gesamtvolumen) aufgenommen, aufgetragen und die Elektrophorese gestartet.

4.6.2.3. Elektrophorese

Alle Elektrophoresen wurden bei konstanter Stromstärke von 50 mA und maximal 500 V durchgeführt. Vor dem Start der Elektrophorese wurde das zwischen TG und UG befindliche Glycerin mit Trenngelpuffer (1 : 4 in H_2O) herauseluiert (Pumpengeschwindigkeit: 30 ml/h, Zeit: 2 h). Nach Start der Elektrophorese wurde so lange mit Trenngelpuffer (1 : 4)

eluiert (5 ml/h), bis die Bromphenolblaubande 0,5 cm vor dem TG-Ende erschien (Dauer ca. 3 - 4 h). Danach wurde die Elutionsgeschwindigkeit auf 60 ml/h erhöht und mit Elektrodenpuffer eluiert. Der Trenngelpuffer und anschließend der Elektrodenpuffer wurden in 3,5 ml Fraktionen am LKB Ultrorac 7000 aufgefangen.
Die gesammelten Fraktionen wurden mittels TCA-Fällung und RIA ausgetestet. Ab dem Zeitpunkt der Elution der Bromphenolblaubande wurden die Fraktionen von 1 ab aufwärts durchnummeriert. Es wurden je Elektrophorese bis zu 350 Fraktionen gesammelt.

4.7. Nachweismethoden für Insulin und Insulinfragmente

Nach Einwirkung von Insulinabbauaktivitäten auf Insulin entstehen Insulinbruchstücke. Mittels TCA-Fällung, Radioimmunoassay (RIA), Gelchromatographie und PAGE kann man Aussagen über Ausmaß und Art des Insulinabbaus machen.

Frühere Ergebnisse (107, 127) und die aus der Literatur bekannten pH-Optima sowie K_M-Werte und v_{max} der beschriebenen Insulinabbauenzyme waren der Grund für die Wahl folgender Inkubationsbedingungen für Insulinabbauuntersuchungen:

Inkubation von 125J-Insulin (50 000 cpm = 0,15 ng/Ansatz) mit Insulinabbauaktivität $\pm$ GSH, $\pm$ natives Insulin, $\pm$ Ionen, bei pH 4,5 und pH 7,4.

Es wurde die Inkubationszeit von 1 h und die Temperatur von + 30° C gewählt, um einen möglichst vollständigen Insulinabbau zu gewährleisten.
Für Untersuchungen mittels RIA, Gelfiltration und PAGE wurde nach Inkubation der Insulinabbau mit NEM gestoppt. Die Inkubationsansätze sind im Ergebnisteil in den entsprechenden Legenden aufgeführt.

Lösungen, die GSH enthielten wurden immer frisch angesetzt und auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt.

4.7.1. TCA-Fällungen

Ein Maß für die Höhe des Insulinabbaus stellen die TCA-löslichen redioaktiven Insulinabbauprodukte dar (31, 58, 60).

Ein Gesamtvolumen von maximal 300 µl zu testender Probe wurde nach Inkubation mit

1 ml 1 % Albumin in H_2O
+ 1 ml 10 % TCA in H_2O

versetzt, gevortext und 15 min. bei 6000 g (Minifuge 2, Tragringrotor), zentrifugiert. Der Überstand wurde abdekantiert und im Gammacounter ausgezählt.

Der Insulinabbau wird in % TCA-Löslichkeit = cpm (TCA-Löslichkeit Probe)/cpm (Gesamt) angegeben. Alle Abbauangaben wurden um den Leerwert (TCA-Löslichkeit des eingesetzten 125J-Insulins) korrigiert.

4.7.2. Bestimmung des immunreaktiven Insulins

Die nach Einwirkung von Insulinabbauaktivität verbleibende Immunreaktivität von 125J-Insulin ist ein Maß für den Insulinabbau (41).

Nach Inkubation der zu testenden Proben wurden

250 µl Probe in 0,1 M KNaPP, pH 7,4/0,03 % Triton oder 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton, mit

\+ 10 µl NEM 100 mM in H_2O versetzt,

vortexen, 5 min stehen,

\+ 50 µl Anti-Insulin-Antiserum, 1:5000, in 0,1 M KNaPP, pH 7,4/0,03 % Triton oder 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton

vortexen, 24 h bei + 4° C stehen lassen,

\+ 200 µl 0,4 % γ-Globulin in 0,1 M KNapp, pH 7,4/0,02 % Azid

\+ 500 µl 20 % PEG in H_2O

gut vortexen, 15 min. bei + 4° C stehen lassen, anschließend 15 min. bei 6000 x g (Minifuge 2, Tragringrotor) zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Pellet im Gammacounter ausgezählt.

Das maximal immunreaktive 125J-Insulin = cpm (AK-fällbar Gesamt) wurde als 100 % gesetzt. Der Insulinabbau wird in % RIA-Fällbarkeit = cpm (AK-fällbar Probe)/cpm (AK-fällbar Gesamt) angegeben. Alle Abbauangaben wurden um den Leerwert (PEG-Fällbarkeit des eingesetzten 125J-Insulins) korrigiert.
Mit dem hier aufgeführten Test wurde nur der Abbau von 125J-Insulin bestimmt. Bei Verwendung von nativem Insulin im Inkubationsansatz wurde folgendermaßen verfahren:

200 µl Probe wurde mit 10 µl NEM (100 mM in H_2O) gestoppt, gevortext und nach 5 min. Stehen mit 50 µl 125J-Insulin (50 000 cpm) versetzt. Anschließend wurde entsprechend der obigen Vorschrift das Anti-Insulin-Antiserum zugesetzt und im weiteren gleich verfahren.

Zusätzlich wurde eine RIA-Eichkurve (0 - 10 000 ng/ml nat. Insulin) erstellt und der Insulinabbau aus der Eichkurve abgelesen.
Als weitere Insulinabbauangabe wird:

Abbau % (RIA) = 100 - % RIA-Fällbarkeit

angegeben.

Bei Verwendung von 125J-Rinderinsulin wurde Anti-Rinderinsulin-Antiserum, bei Verwendung von 125J-Schweineinsulin das Anti-Schweineinsulin-Antiserum eingesetzt.

4.7.3. Gelchromatographie an Sephadex G50 fine

Die Gelchromatographie von 125J-Insulin nach Einwirkung von Insulinabbauaktivität macht nicht nur über die Höhe des Insulinabbaus, sondern auch über die Größe der Insulinabbaubruchstücke eine Aussage.

Nach Inkubation der zu testenden Proben wurden

250 µl Probe in 0,1 M KNaPP, pH 7,4/0,03 % Triton oder 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton, mit
+ 10 µl NEM 100 mM in H_2O versetzt,
vortexen, 5 min. stehen bei Raumtemperatur
+ 50 µl 1 M HAc/0,1 % Triton
vortexen, dann wurde das Reaktionsgemisch mittels Gelchromatographie aufgetrennt oder bei - 30° C bis zur Aufarbeitung aufbewahrt.

Gelchromatographie:

Säule/-material:	1,2 x 100 cm/Sephadex G50 fine
Elutionsmittel:	1 M HAc/0,1 % Triton
Elutionsgeschwindigkeit:	8 ml/h
Fraktionsvolumen:	1,25 ml
Elutionstemperatur:	Raumtemperatur

Die nach dem Säulenlauf erhaltenen Fraktionen wurden am Gammacounter ausgezählt. Die Radioaktivität in den Fraktionen wird als % cpm_{ges} = $cpm_{Fraktion}/cpm_{ges}$ angegeben. Die Radioaktivität der aufgetragenen Probe entspricht cpm_{ges}.

4.7.4. Polyacrylamidgelelektrophorese

Als weiteres System zur Unterscheidung von 125J-Insulinbruchstücken wurde die PAGE angewandt, welche Substanzen nach Ladung und Größe auftrennt.
Die Proben wurden auf 500 - 3000 cpm/50 µl Auftragvolumen je Tasche eingestellt. Es wurden Proben mit und ohne Stoppen des Insulinabbaus durch NEM untersucht.

Für die Elektrophoresen wurden 16 %ige Trenngele und 4 %ige Sammelgele verwendet und nach Anleitung (4.6.1.) verfahren. Zur Auswertung der Bandenmuster wurden die R_F-Werte bestimmt. Dabei ist der R_F-Wert definiert als Quotient aus Laufstrecke der Radioaktivitätsbande zur Laufstrecke der Bromphenolblaubande.

4.8. Partielle Reinigung der Insulinabbauaktivität aus Rattenlebermikrosomen

4.8.1. Präparation von Rattenlebermikrosomen

Die Präparation der Rattenlebermikrosomen wurde nach Koch (106) durchgeführt.

Ratten: Stamm, Sprague-Dawle
Süddeutsche Versuchstierfarm, Tuttlingen
männlich oder weiblich, 120 - 130 g
12 - 15 h vor Leberentnahme nüchtern gesetzt.

Puffer: A) 0,01 M KNaPP pH 7,4/0,25 M Suchrose
B) 0,1 M KNapp pH 7,4

Nach Dekapitation und Ausbluten der Ratten (18 - 20 Tiere) wurden die Lebern entnommen und auf Eis gelegt. Alle nachfolgenden Schritte der Präparation erfolgten bei 0 - 4° C. 80 - 100 g Rattenleber wurden mit Wasser abgespült, mit dem Skalpell zerkleinert, in insgesamt 500 ml Puffer A suspendiert und in einem Glas-Teflon-Homogenisator 60 ml-Potter S (Fa. Braun Melsungen) homogenisiert (je Portion 10 Hübe bei 100 rpm).
Danach wurden verschiedene Zentrifugationen angeschlossen:

1. Zentrifugation: 10 min. bei 2400 rpm (600 x g)
WKF G50K, Rotor 6 x 250

Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet verworfen.

2. Zentrifugation: 30 min. bei 11 000 rpm (13 000 x g)
WKF G50K, Rotor 6 x 250

Der Überstand wurde abdekantiert und das Pellet verworfen.

3. Zentrifugation: 35 min. bei 35 000 rpm (97 000 x g) Beckmann Ultrazentrifuge L5-65, Rotor 45 TI

Der Überstand wurde verworfen.

Das Pellet wurde in 120 ml Puffer B aufgenommen, mittels eines Dounce-Homogenisator, Kolben L (Fa. Braun Melsungen) suspendiert und 35 min. bei 35 000 rpm wie zuletzt zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurde das Pellet in 20 ml Puffer B suspendiert (Dounce-Homogenisator, Kolben L), ein Aliquot von 1 ml entnommen (LM = Lebermikrosomen), bei - 30° C eingefroren und der Rest zur Extraktion mit Triton X-100 verwendet. Der Proteingehalt verschiedener Präparationen ist aus Tabelle 2 (5.2.1.2.) ersichtlich.

4.8.2. Tritonextraktion von Rattenlebermikrosomen

Die Lebermikrosomen (ca. 25 mg Protein/ml) wurden mit einer 22,5 %igen Triton X-100-Lösung auf eine Endkonzentration von 1,5 % an Triton (v/v) gebracht und 50 min. bei Raumtemperatur gerührt.
die Suspension wurde anschließend 35 min. bei 40 000 rpm (105 000 x g) in der Beckmann Ultrazentrifuge L5-65, Rotor 75 Ti zentrifugiert, der Überstand abdekantiert, ein Aliquot von 1 ml für spätere Bestimmungen entnommen (LME = Lebermikrosomenextrakt), tiergefroren (bei - 30° C) aufbewahrt und der verbleibende Lebermikrosomenextrakt sofort zur Tritonentfernung an Servachrom XAD-2 verwendet. Der Proteingehalt verschiedener Lebermikrosomenextrakte ist aus Tabelle 2 (5.2.1.2.) zu ersehen.

4.8.3. Chromatographie an Servachrom XAD-2

Der Tritonextrakt wurde zur Entfernung von Triton an Servachrom XAD-2 chromatographiert (nach 127, modifiziert nach 33, 82).

Säule/-material:	2,6 x 15 cm/Servachrom XAD-2
Elutionspuffer:	0,1 M KNaPP pH 7,4
Bindungskapazität:	2,5 g Triton X-100

Die XAD-Säule wurde vor Auftrag des Lebermikrosomenextraktes mit 500 ml 0,1 M KNaPP, pH 7,4/0,01 % Azid und anschließend 500 ml Elutionspuffer (Elutionsgeschwindigkeit 600 ml/h) äquilibriert. Dann wurde der Extrakt einer gesamten Präparation aus 4.8.2. (ca. 25 mg Protein/ml) aufgetragen (Elutionsgeschwindigkeit 10 ml/h) und mit 240 ml Elutionspuffer (3 - 4-faches Säulenvolumen) mit gleicher Elutionsgeschwindigkeit nachgewaschen. Die ersten 15 ml Eluat (Totvolumen der Säule) wurden verworfen und das restliche Eluat in einem 500 ml Becherglas aufgefangen.
Das Säulenmaterial wurde nicht regeneriert. Es wurden maximal fünf Extrakte (insgesamt 100 ml, 1,5 % an Triton) an der gleichen Säule unter gleichen Bedingungen chromatographiert.
Zur Aufbewahrung wurde die XAD-2 Säule mit 0,1 M KNaPP, pH 7,4/0,01 % Azid äquilibriert.
Das erhaltene trübe Eluat wurde dann mittels Dialyse umgepuffert: Der Dialyseschlauch (6,5 ml/cm) wurde in Wasser/10 mM EDTA x Na_2 2 h gequollen und mit Wasser EDTA-frei gewaschen. Das XAD-2-Eluat (XADE) wurde in den Dialyseschlauch gefüllt, 2 h gegen Wasser (15-faches Volumen), dann gegen 0,1 M Tris/HCl, pH 7,6 (25-faches Volumen) dialysiert, wobei der Dialysepuffer nach 2 h, 15 h und 24 h gewechselt wurde. Während der Dialyse nimmt die Trübung des Retentat zu. Das Retentat wurde 30 min. bei 15 000 rpm (20 000 x g) in der WKF-Zentrifuge G50K, Rotor 8 x 38 zentrifugiert, der Überstand abdekantiert, das Pellet in 20 ml 0,1 M Tris/HCl, pH 7,6 sus-

pendiert, bei 15 000 rpm 30 min. wie zuletzt zentrifugiert, die Überstände vereinigt (XADEÜ = XAD-2-Eluat-Überstand) und deren Volumen bestimmt. Das Pellet (XADEP = XAD-2-Eluat-Pellet) wurde mit 0,1 M KNaPP pH 7,4/0,5 % Triton auf ein Volumen von 10 ml eingestellt, suspendiert und bei - 30° C eingefroren. Vom Überstand wurden 5 ml Aliquot für spätere Bestimmungen entnommen, bei - 30° C eingefroren und der Rest zur Anionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A50 verwendet. Der Proteingehalt verschiedener XADEP und XADEÜ ist aus Tabelle 2 (5.2.1.2.) zu ersehen.

4.8.4. Chromatographie an DEAE-Sephadex A50

Die wasserlöslichen Membranproteine wurden durch Chromatographie an dem Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A50 aufgetrennt.

Säule/-material:	3,5 x 20 cm/DEAE-Sephadex A50
Elutionspuffer:	0,1 M Tris/HCl pH 7,6
Elutionsgeschwindigkeit:	25 ml/h
Fraktionsvolumen:	8,75 ml
Elutionstemperatur:	+ 4° C
UV-Durchflußphotometer:	275 nm

Je nach Präparation wurden 200 - 350 ml XADEÜ (ca. 1 mg Protein/ml) auf die Säule aufgetragen und mit Elutionspuffer nachgewaschen, bis am Fraktionsschreiber die Basislinie erreicht wurde. Anschließend wurde mittels eines Stufengradienten von 0,1/0,18/0,3/0,3 - 1,0 (linear) M NaCl in Elutionspuffer eluiert. Die verwendete Puffermenge je Stufe betrug die dreifache Menge des Säulenvolumens.
Das Eluat wurde am Fraktionssammler aufgefangen und die Fraktionen mittels TCA-Fällung und RIA auf Abbau von 125J-Insulin durch Insulinabbauenzyme untersucht. Die Insulinabbauaktivität enthaltenden Spitzenfraktionen wurden bei - 30° C aufbewahrt.

4.9. Molekulargewichtsbestimmung der Insulinabbauaktivitäten

Die Molekuargewichte der Insulinabbauaktivitäten wurden durch Gelfiltration an Sephacryl S300 Superfine und mittels SDS-PAGE bestimmt.
Die Spitzenfraktionen der vier nach Ionenaustauschchromatographie gefundenen Aktivitäten A, B1, B2 und C (vergl. Abb. 6) wurden jeweils vereinigt, dialysiert, lyophilisiert, in 1 ml 0,1 M KNaPP pH 7,4 aufgenommen und von unlöslichem Protein durch Zentrifugation (Minifuge 2 Trägringrotor) abgetrennt. 500 µl Probe wurden anschließend an Sephacryl S300 chromatographiert.

4.9.1. Gelfiltration an Sephacryl S300 Superfine

Säule/-material:	1,3 x 170 cm/Sephacryl S300 Superfine
Elutionspuffer:	0,1 M KNapp pH 7,4
Elutionsgeschwindigkeit:	8 ml/h
Fraktionsvolumen:	3,5 ml
Elutionstemperatur:	+ 4° C
UV-Durchflußphotometer:	275 nm

Zur Molekulargewichtsbestimmung wurde das Ausschlußvolumen mit Thyroglobulin und der Salzpeak mit KJ bestimmt. Als Standardproteine dienten:

Protein	MG
Ferritin	440 000
Katalase	232 000
Aldolase	158 000
Albumin	68 000
Ovalbumin	43 000
Chymotrypsinogen A	25 000

Die Elutionsvolumina wurden anhand der Absorptionsmaxima der Standardproteine im UV-Durchflußphotometer, die Abbauenzyme durch Austesten des 125J-Insulinabbaus bestimmt.

Die Auswertung erfolgte durch Auftragen von K_{av} gegen den Logarithmus des Molekulargewichtes.

$$K_{av} = (V_e - V_o)/(V_t - V_o)$$

V_e = Elutionsvolumen der Standardproteine oder Abbauenzyme
V_o = Ausschlußvolumen
V_t = Totalvolumen der Säule

4.9.2. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Elektrophorese wurde wie unter 4.6.1. durchgeführt. Es wurden folgende Standardproteine verwendet:

Protein	MG
Phosphorylase b	90 000
Albumin	68 000
Ovalbumin	43 000
Chymotrypsinogen A	25 000

Der R_F-Wert der Standardproteine und der Hauptbanden der Abbauaktivität nach Gelfiltration ist definiert als Quotient der Laufstrecke der Proteinbande und der Laufstrecke der Bromphenolblaubande.

4.10. Photoaffinitätsmarkierung der Insulinabbauaktivitäten

Zur Photoaffinitätsmarkierung wurden die Proben in 1 ml Eppendorf Cups vorpipettiert. Unter Eiskühlung wurde im Dunkeln mit 125J-MABI 10 min. inkubiert. Anschließend wurde unter Eiskühlung in einem Abstand von 30 cm 10 min. mit UV-Strahlung (UV-Lampe, Philips HPK 125 W) belichtet. Die kurzwelligen Anteile (unter 300 nm) der UV-Quelle wurden durch ein dazwischen gelegtes Duranglas herausfiltriert. Nach Belichtung wurde dieser Vorgang unter den gleichen

Bedingungen mit frisch zugefügtem 125J-MABI viermal wiederholt. Die letzte Belichtung wurde auf 20 min. erhöht. Danach wurden die Proben 2 h gegen dest. Wasser (100-faches Volumen) und 12 h gegen 0,01 M Tris/HCl, pH 6,9 dialysiert. Die Proben (250 - 300 µl) wurden dann im Exsikkator über P_2O_5 getrocknet, im Gammacounter ausgezählt, auf gleiche Volumina eingestellt, auf der Elektrophorese (7 - 14 % Gradientengele) aufgetrennt, die Gele angefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

4.11. Affinitätschromatographie

Zur Affinitätschromatographie der Insulinabbauaktivitäten B1 und C (vgl. Abb. 6) wurde Mercaptopyridin-aktivierte-GSH-Sepharose 4B verwendet, deren Herstellung im Folgenden beschrieben ist. Die Herstellung der Mercaptopyridin-aktivierten-GSH-Sepharose 4B wurde bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Alle verwendeten Lösungen wurden entlüftet und mit N_2 begast.

4.11.1. Präparation von GSH-Sepharose nach (135)

Es wurden folgende Puffer verwendet:

KP = Kupplungspuffer, 0,1 M $NaHCO_3$, pH 8,3/0,15 M NaCl
WP1 = Waschpuffer 1, 0,1 M NaAc, pH 4,0/0,5 M NaCl
WP2 = Waschpuffer 2, 1,0 M NaCl/1 mM EDTA Na_2
TP = Trispuffer, 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0/0,3 M NaCl/ 1 mM EDTA Na_2

3 g CNBr-aktivierte Sepharose 4B wurden in 100 ml 1 mM HCl 15 min. gequollen, mit 200 - 400 ml 1 mM HCl auf einer G3-Fritte gewaschen und gut abgesaugt. 100 mg Glutathion oxidiert (GSSG) wurden in 5 ml KP gelöst und auf pH 8,3 eingestellt. Dazu wurde die gewaschende CNBr-Sepharose gegeben und mit KP auf 50 ml aufgefüllt. Danach wurde durch

die Lösung 3 h lang N_2 (bei RT) geleitet, anschließend auf der G3-Fritte mit KP, WP1 und TP gewaschen (je 200 ml). Mit 0,2 M Glycinlösung (50 ml) unter N_2 Begasung wurden die verbleibenden CNBr-Gruppen umgesetzt (2 h RT). Anschließend wurde das Gel wie oben gewaschen.

4.11.2. Aktivierung mit 2,2'-Dipyridyl-Disulfid nach (14, 15, 79, 80)

Das in 4.11.1. gewonnene Gel wurde in 45 ml TP suspendiert und 150 mg DTE (in 5 ml TP) zugegeben, 30 min. N_2 (RT) durchgeleitet, mit WP2 und TP (je 200 ml) auf der G3-Fritte gewaschen, ohne Luft durch das Gel zu saugen. Das Gel wurde dann in 50 ml TP-suspendiert und unter N_2 Begasung (RT) 10 Portionen a 100 µl 2,2'-Dipyridyl-Disulfid (55 mg/ml Propanol-2) zugegeben und weitere 30 min begast. Anschließend wurde mit Propanol-2 (100 ml) und TP auf der G3-Fritte gewaschen.

4.11.3 Prüfung der Gelbeladung an Glutathion

1 ml Mercaptopyridin-aktivierte-GSH-Sepharose 4B wurde mit 10 mg DTE versetzt, mit TP auf 5 ml aufgefüllt und 30 min. unter N_2-Begasung (RT) reduziert und der Überstand am Photometer bei 343 nm auf den Gehalt an Mercaptopyridin geprüft. Mittels Eichkurve wurde die Konzentration des freigesetzten Mercaptopyridins bestimmt.

5 ml Gel entsprechen 15 µMol an Mercaptopyridin = GSH-Beladung

4.11.4. Durchführung der Affinitätschromatographie

Die vereinigten Spitzenfraktionen der Insulinabbauaktivitäten B1 oder C (nach DEAE-Sephadex A50 Säulenlauf, Abb. 6) wurden

vor der Affinitätschromatographie mit DTE (1mM Endkonzentration) und Azid (0,01 % Endkonzentration) versetzt, 1 h bei RT unter Sauerstoffausschluß inkubiert und danach mehrmals gegen Laufpuffer bei + 4° C dialysiert, bis kein DTE mehr im Dialysat nachweisbar war.

Laufpuffer: 0,05 M Tris/HCl pH 7,5/50 mM NaCl/25 mM KCl/1 mM EDTA Na_2

Während der Dialyse wurde der Dialysepuffer mit N_2 begast. Der Nachweis auf DTE im Dialysat erfolgte mit Ellman's-Reagenz (5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoesäure)) am Photometer bei 412 nm (ε = 13600 $M^{-1}cm^{-1}$).

10 ml Mercäptopyridin-aktivierte-GSH-Sepharose 4B wurden in eine Säule gefüllt und mit sauerstoffreiem Laufpuffer äquilibriert (50 ml). Anschließend wurde die dialysierte Probe bei RT mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 10 ml/h aufgetragen und bei + 4° C mit Laufpuffer nachgewaschen. Das nicht gebundene Protein wurde für spätere Abbautests bei - 30° C gelagert. Die Säule wurde dann nacheinander mit folgenden Puffern:

1.) Laufpuffer, 20 mM an Cystein, 30 ml
2.) Laufpuffer, 20 mM an GSH, 30 ml
3.) Laufpuffer, 20 mM an DTE, 30 ml

bei RT eluiert. Es wurden Fraktionen von 1 ml aufgefangen und mit einer Laufgeschwindigkeit von 2 ml/h eluiert. Die Eluate 1, 2 und 3 wurden jeweils vereinigt und gegen Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4 (100-faches Volumen), 2 x 3 h und 1 x 12 h dialysiert. Das Cystein-Eluat wurde vor Dialyse mit DTE versetzt (30 mM Endkonzentration), um die Oxidation von Cystein zu Cystin, welches unlöslich ist, zu verhindern. Die einzelnen Eluate wurden auf ihren Proteingehalt und ihre Abbauaktivität geprüft.

5. E R G E B N I S S E

5.1. Allgemeines zu den Insulinabbauuntersuchungen

In der Literatur sind bereits verschiedene Insulinabbauenzyme, sowie Methoden zur Bestimmung des Insulinabbaus (17, 31, 49) beschrieben. Die lysosomalen Enzyme sind im pH-Bereich von pH 3 - 5,5 aktiv (9). Cytosolische sowie membrangebundene Insulinabbauenzyme werden mit einem pH-Optimum von pH 7,0 - 8,0 angegeben (7, 17, 46). Die meisten beschriebenen Enzyme sind SH-abhängig und durch NEM, einem SH-Blocker hemmbar. Die K_M-Werte der Enzyme sind unterschiedlich und liegen im Bereich von 1×10^{-8} - 5×10^{-5} M. Frühere Untersuchungen zum Insulinabbau (107, 127) haben folgende Abhängigkeiten der Abbauaktivität aus Mikrosomenextrakten gezeigt:

A) GSH und zweiwertige Ionen (Ca, Mg, Mn) aktivieren die Insulinabbauaktivität aus Mikrosomenextrakten.

B) Chelatbildner (EDTA, o-Phenanthrolin) und SH-Blocker (NEM, Jodacetamid und andere) hemmen die Insulinabbauaktivität aus Mikrosomenextrakten.

C) Untersuchungen zum pH-Optimum von Insulinabbauaktivität aus Mikrosomenextrakten ergaben zwei pH-Bereiche, in denen Abbauaktivität meßbar war
   a) unterhalb von pH 5,5
   b) pH 7,0 - 8,0

Diese Ergebnisse und die aus der Literatur bekannten pH-Optima, sowie K_M-Werte und v_{max} der beschriebenen Insulinabbauenzyme waren der Grund für die Wahl folgender Inkubationsbedingungen für Insulinabbauuntersuchungen:

Inkubation von 125J-Insulin mit Insulinabbauaktivität $\pm$ GSH, $\pm$ natives Insulin, $\pm$ Ionen, bei pH 4,5 und pH 7,4.

Um einen möglichst vollständigen Insulinabbau zu gewährleisten, wurde die Inkubationszeit von 1 h und die Temperatur von + 30° C gewählt. Die Bindung von Insulin (bei Einsatz geringer Insulinkonzentrationen) an die Wandung von Reaktionsgefäßen wurde durch Zugabe von Triton (0,03 % Endkonzentration im Inkubationsansatz) verhindert.

Zu Insulinabbauuntersuchungen wurde Chloramin T oder Peroxidase jodiertes Rinder- oder Schweineinsulin verwendet. Diese werden im Text allgemein als 125J-Insulin bezeichnet und sind in den entsprechenden Legenden durch folgende Schreibweise (vgl. Kap. 2)

CT-125J-Insulin	Chloramin T jodiertes Insulin Rind
125J-A14-Insulin	Monokomponentes Mono-^{125}J-(Tyr^{A14})-Insulin Rind (Schwein)

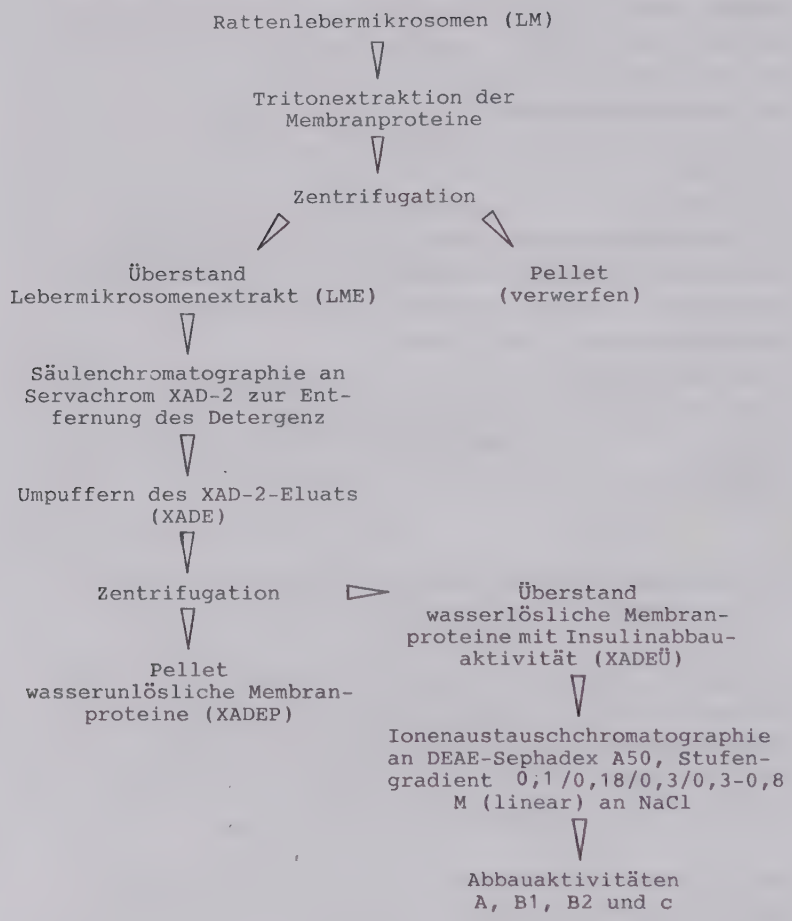
genau definiert.

5.2. Partielle Reinigung und Trennung der Insulinabbauaktivität aus Rattenlebermikrosomen

Wie in 5.1. gezeigt, enthalten Rattenlebermikrosomen Insulinabbauaktivität. Aufgrund der unterschiedlichen Aktivierung und Inaktivierung der Insulinabbauaktivität aus Lebermikrosomenextrakten handelt es sich hier um mindestens zwei verschiedene Insulinabbauaktivitäten.

Nach folgendem Aufarbeitungsschema wurde eine teilweise Reinigung und Auftrennung der unterschiedlichen Insulinabbauaktivitäten erreicht. Von den einzelnen Stufen der Aufarbeitung (LM, LME, XADEÜ, XADEP und den Abbauaktivitäten B1, B2, C) wurden Proben entnommen und mittels TCA-Fällung, Radioimmunoassay, Gelchromatographie an Sephadex G50 fine und PAGE der Abbau von 125J-Insulin untersucht.

Aufarbeitungsschema:



Das Detergenz Triton X-100 dient zum Herauslösen von membrangebundenen Bestandteilen aus Lebermikrosomen. Es hatte sich beim Aufarbeiten (Konzentrieren und Gelchromatographie) von Lebermembranextrakten (127) als störender Faktor erwiesen. Nach Abtrennung des Triton X-100 durch Chromatographie an Servachrom XAD-2 erhält man eine trübe Proteinlösung. Es fallen hier die wasserunlöslichen Membranbestand-

teile aus. Die Tritonkonzentration liegt nach dieser Behandlung unterhalb der Mizellenkonzentration von 0,017 % (33, 82) und man erhält durch Dialyse des XAD-2 Eluates ein freies Retentat. Durch Zentrifugation (10000 x g Servall, SS34) wurden die unlöslichen Bestandteile abgetrennt. Wie in 5.3.1.2. und 5.3.2.3. beschrieben, sind die Insulinabbauaktivitäten überwiegend wasserlöslich und befinden sich nach Zentrifugation im Überstand. Aus diesem Grund wurden keine anderen Verfahren zur Solubilisierung von Membranproteinen durchgeführt.

Durch Gelchromatographie an Sephacryl S300 Superfine oder Sepharose CL 4B konnte keine Auftrennung der Insulinabbauaktivitäten erreicht werden (127). In Vorversuchen erwies sich der Anionenaustauscher DEAE-Sephadex A50 als geeignet. Die Abbauaktivität wurde bis auf eine Komponente vom Austauscher gebunden und war mit NaCl in Elutionspuffer eluierbar. Abbildung 5 zeigt das Elutionsprofil eines Triton-freien Extraktes (XADEÜ) an DEAE-Sephadex A50 mittels linearem Gradienten von 0 - 0,7 M NaCl in Elutionspuffer. Wie daraus zu ersehen ist, wird eine Insulinabbauaktivität nicht vom Säulenmaterial gebunden und ist bei saurem pH aktiv (als Aktivität A bezeichnet), während eine zweite Aktivität bei einer Ionenstärke von 0,1 - 0,12 M NaCl (als Aktivität B bezeichnet) und eine dritte Aktivität danach eluiert (als Aktivität C bezeichnet).

Um eine bessere Trennung der beiden mit NaCl eluierbaren Abbauaktivitäten B und C zu erreichen, wurden die folgenden Aufarbeitungen immer mit einem Stufengradienten eluiert. Die Salzkonzentrationen wurden nach folgenden Kriterien gewählt:

Stufe 1: 0,1 M NaCl in Elutionspuffer. Bei dieser NaCl-konzentration wird die Aktivität B vom Säulenmaterial verdrängt (Abb. 5 b/c, Fraktion 62).

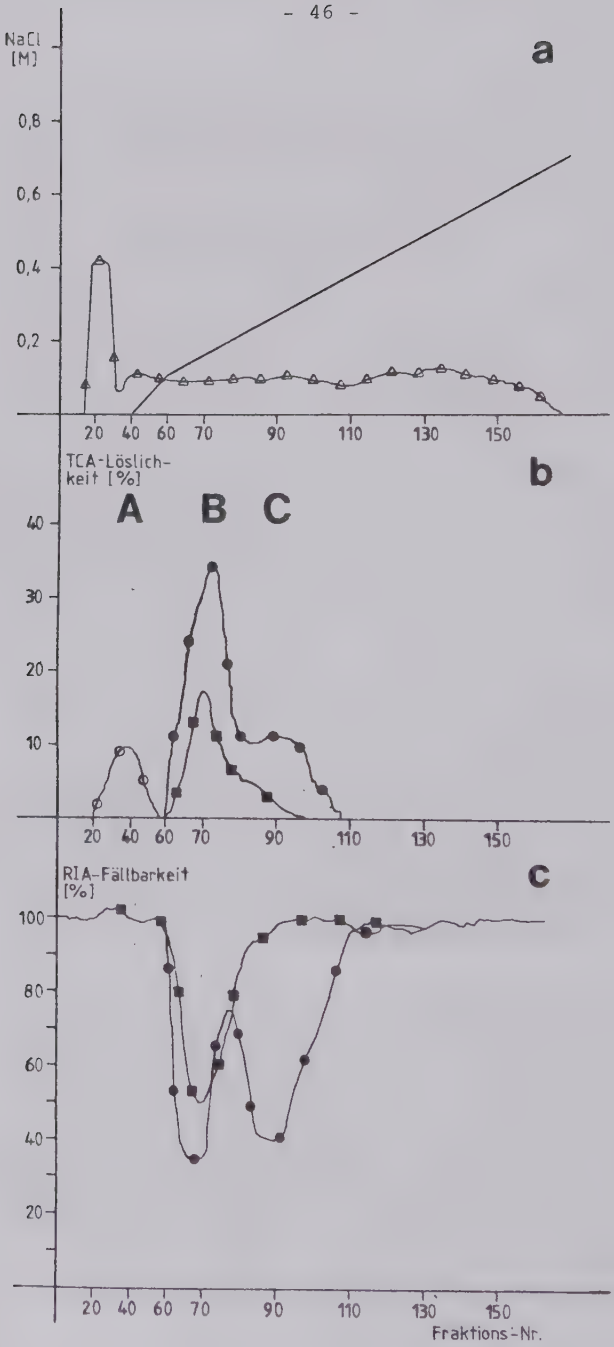

NaCl [M]
a
0,8
0,6
0,4
0,2
20 40 60 70 90 110 130 150
TCA-Löslichkeit [%]
b
A B C
40
30
20
10
20 40 60 70 90 110 130 150
RIA-Fällbarkeit [%]
c
100
80
60
40
20
20 40 60 70 90 110 130 150
Fraktions-Nr.

Abbildung 5:

Abbildung 5: Trennung von tritonfreiem Extrakt (XADEÜ) an DEAE-Sephadex A50 mit linearem NaCl-Gradienten (a) und Nachweis der Insulinabbauaktivitäten mittels TCA-Fällung (b) und Radioimmunoassay (c).

Säule/-material:	1,1 x 20 cm/DEAE-Sephadex A50
Elutionspuffer:	0,1 M Tris/HCl pH 7,6
Elutionsgeschwindigkeit:	12 ml/h
Fraktionsvolumen:	5 ml
Elutionstemperatur:	+ 4° C
UV-Durchflußphotometer:	275 nm
Gradient:	linear, 0 - 0,7 M NaCl in Elutionspuffer (insgesamt 800 ml)

Inkubationsansatz:

ca. 50 000 cpm	125J-A14-Insulin Rind, in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton oder 0,1 M NaAc pH 4,5/0,03 % Triton (Tris/HCl o. NaAc)
+ 50 µl	Fraktion in 0,1 M Tris/HCl pH 7,6
+/- 10 µl	Ionen 1 mM (Ca, Mg, Mn, zweiwertig)
+/- 10 µl	GSH 20 mM
+	Tris/HCl oder NaAc ad 250 µl,

die Proben wurden 60 min bei 30° C inkubiert und wie unter 4.7.1./2. weiter verfahren.

5 a: ——— NaCl-Gradient —△—△— Elutionsprofil 275 nm

Der Abbau wurde getestet bei:

5 b/c: pH 4,5 —○—○—

pH 7,4 —■—■— +/- Ionen 40 µM

pH 7,4 —●—●— + GSH 0,8 mM

Stufe 2: 0,18 M NaCl in Elutionspuffer. Diese NaCl-Konzentration liegt im absteigenden Ast des Abbaupeaks der Aktivität B (Abb. 5 b/c, Fraktion 72/73) und sollte Protein verdrängen welches vor dem Aktivitätspeak C eluiert.

Stufe 3: 0,3 M NaCl in Elutionspuffer. Diese NaCl-Konzentration liegt im absteigenden Ast des Abbaupeaks der Aktivität C (Abb. 5 b/c, Fraktion 100) und sollte die Abbauaktivität C vom Säulenmaterial verdrängen.

Abbildung 6 zeigt das typische Elutionsprofil einer Chromatographie an DEAE-Sephadex A50 mittels eines Stufengradienten. Eine Abbauaktivität wurde wie in Abb. 5 vom Ionenaustauscher nicht gebunden und baut nur im Sauren pH-Bereich ab. Mit 0,1 M NaCl, 0,18 M NaCl und 0,3 M NaCl wurde jeweils Insulinabbauaktivität eluiert. Im Folgenden werden die in dieser Reihenfolge verdrängten Aktivitäten mit A, B1, B2 und C bezeichnet.

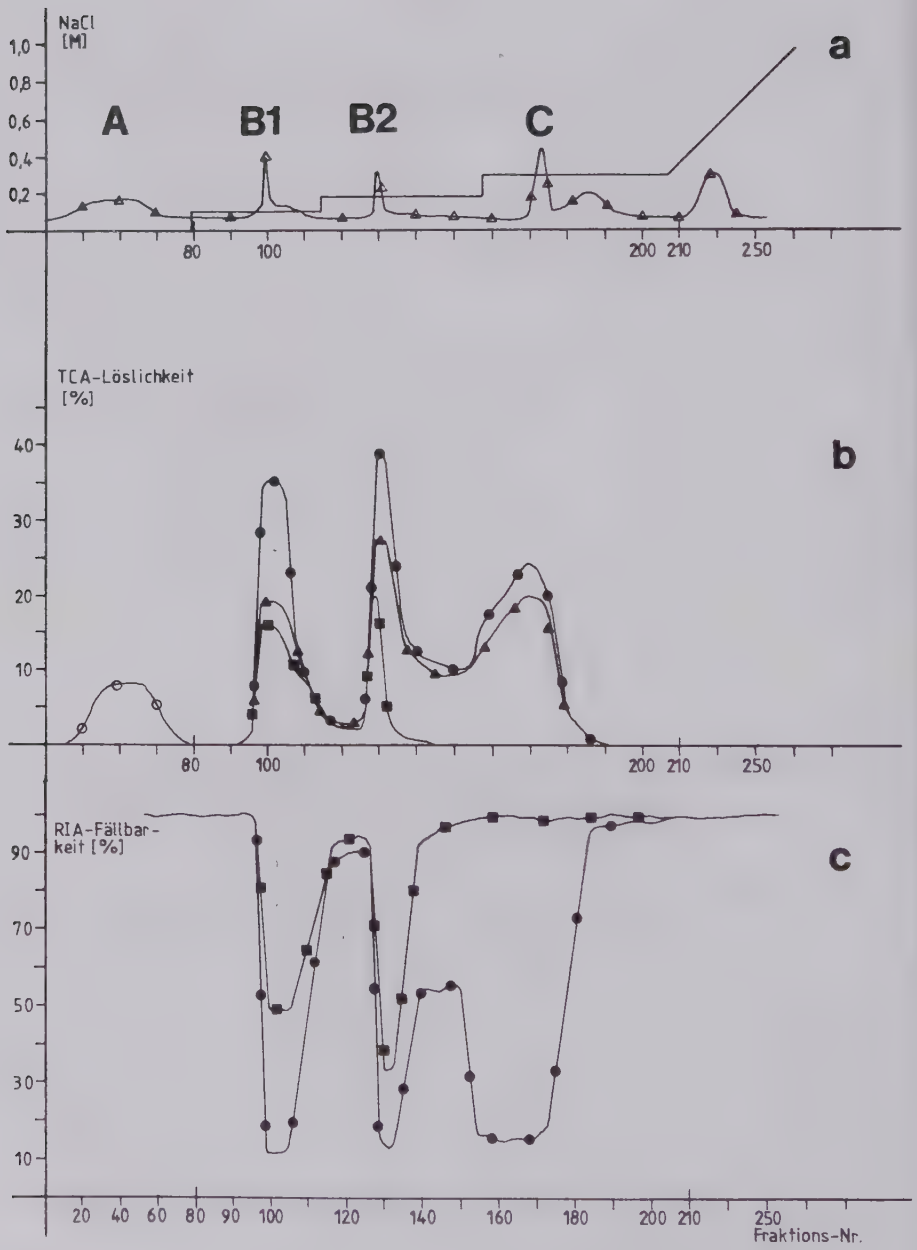

NaCl
[M]
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
A
B1
B2
C
a
80
100
200
210
250
TCA-Löslichkeit
[%]
40
30
20
10
b
80
100
200
210
250
RIA-Fällbar-
keit [%]
90
70
50
30
10
c
20
40
60
80
90
100
120
140
160
180
200
210
250
Fraktions-Nr.

Abbildung 6:

Abbildung 6: Trennung von tritonfreiem Extrakt (XADEÜ) an DEAE-Sephadex A50 mit 0,1/0,18/0,3/0,3-1,0 (linear) M NaCl-Stufengradienten (a) und Nachweis der Insulinabbauaktivitäten mittels TCA-Fälluung (b) und Radioimmunoassay (c) (Kap. 4.7.1./2. und 4.8.4).

Inkubationsansatz wie in Abbildung 5.

6 a: ——— NaCl-Gradient —△—△— Elutionsprofil 275 nm

Der Abbau wurde getestet bei:

6 b/c:	pH 4,5	—○—○—	+/- GSH/Ionen	800/40 µM
	pH 7,4	—■—■—	+/- Ionen	40 µM
	pH 7,4	—●—●—	+ GSH	0,8 mM
	pH 7,4	—▲—▲—	+ GSH + nat. Insulin	800/7 µM

Für das Auftreten der Aktivität B2 wurden folgende Erklärungen in Betracht gezogen:

1. Es handelt sich um eine Abbauaktivität, welche mittels linearem Gradienten vom Abbauprofil her nicht zu identifizieren ist.
2. Es wird mit 0,1 M NaCl nicht sämtliche Aktivität B1 eluiert und daher mittels 0,18 M NaCl noch Aktivität nacheluiert.
3. Es wird mit 0,18 M NaCl bereits ein Teil Aktivität C eluiert.
4. Es wird mit 0,18 M NaCl restliche Aktvität B2 und bereits ein Teil Aktivität C eluiert.

Aus Abbildung 6 ist weiterhin zu ersehen, daß die Aktivität A keine Abhängigkeit gegenüber GSH oder Ionen zeigt und nur im sauren pH-Bereich abbaut.
Durch Ionen wurde keine Aktivierung der Aktivitäten B1, B2 und C erreicht, während durch GSH deren Aktivierung möglich war. Die Aktivität C zeigt ohne GSH keine Abbauaktivität, die Aktivitäten B1 und B2 bauen auch ohne GSH im Inkubationsansatz Insulin ab.

Da der Abbau von Insulin vom K_M-Wert und v_{max} der Insulinabbauenzyme abhängig ist (5.1.) wurde nat. Insulin dem Inkubationsansatz zugesetzt, um zu sehen, ob Veränderungen

des Abbauprofils auftreten. Die Konzentration von nat. Insulin (7 µM) liegt im Substratsättigungsbereich der in der Literatur beschriebenen proteolytischen Enzyme (K_M-Wert ~ 0,5 x 10^{-7} M) und unterhalb des Sättigungsbereiches der in der Literatur beschriebenen Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (K_M-Wert ~ 5 x 10^{-5} M). Durch Einsatz von nat. Insulin im Inkubationsansatz trat keine Veränderung des Insulinabbauprofils der Aktivitäten B1, B2 und C auf. Der Gesamtabbau ist allerdings etwas erniedrigt.

5.3. Insulinabbauuntersuchungen der Aufarbeitungsstufen von Rattenlebermikrosomen

5.3.1. TCA-Fällung und Radioimmunoassay

TCA-Fällungen geben bevorzugt Auskunft über das Entstehen niedermolekularer Abbaubruchstücke. Da auch höhermolekulare Abbauprodukte entstehen können, die zum Teil wie intaktes 125J-Insulin ausgefällt werden, wird der Gesamtabbau durch die TCA-Fällung unterschätzt.

Mittels RIA wird immunreaktives Insulin bestimmt. Man erhält mit dieser Methode wesentlich genauere Aussagen über den Insulinabbau.

5.3.1.1. Untersuchungen zur Aktivierung und Inhibierung der Abbauaktivitäten A, B1 , B2 und C

Die Spitzenfraktionen der Insulinabbauaktivitäten (A, B1, B2 und C) wurden im einzelnen auf ihre Aktivierbarkeit durch verschiedene zweiwertige Ionen und die Hemmbarkeit durch verschiedene Proteinabbauinhibitoren untersucht. Abbildung 7 zeigt die Abhängigkeit gegenüber Ionen, Abbildung 8 gegen-

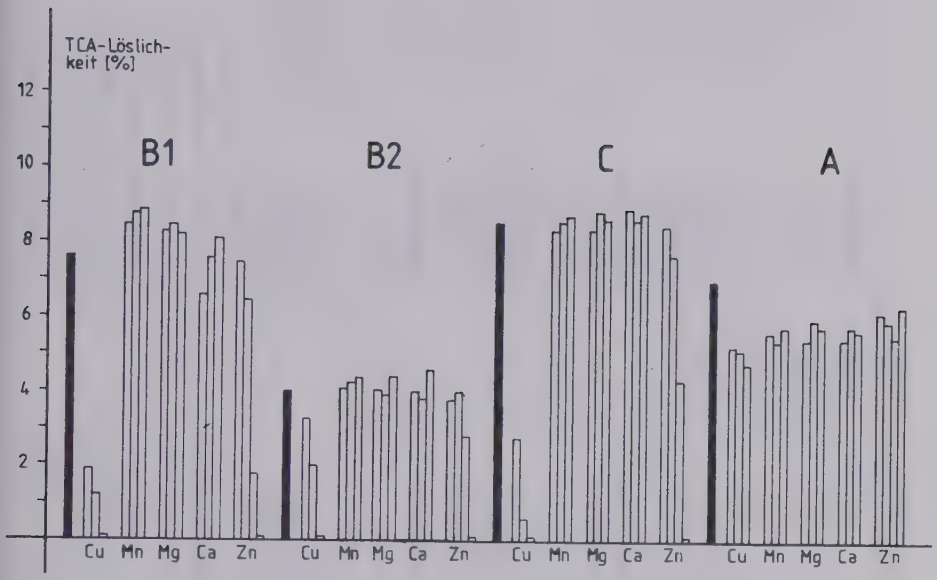


Abbildung 7: Ionenabhängigkeit der Insulinabbauaktivität A, B1, B2 und C.

Inkubationsansatz:

50 000 cpm CT125J-Insulin in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton oder 0,1 M NaAc, pH 4,5/0,03 % Triton (Tris/HCl o. NaAc)
\+ 20 µl Spitzenfraktion A, B1, B2, C
\+ 10 µl GSH 10 mM
+/- 10 µl Ionen
\+ Tris/HCl oder NaAc ad 250 µl

Die Proben wurden 60 min. bei + 30° C inkubiert und TCA-gefällt. Die Schwarzen Säulen entsprechen der TCA-Löslichkeit der Abbaubruchstücke ohne Ionen im Inkubationsansatz. Als Ionen wurden die zweiwertigen Chloride von Cu, Mn, Mg, Ca, Zn eingesetzt. Die Ionenkonzentration betrug 1, 10 und 100 µM im Ansatz, für Zn zusätzlich 1 mM. Die Säulen sind mit steigender Konzentration von links nach rechts dargestellt. TCA-Fällung siehe 4.7.1..

über den Abbauinhibitoren. Aufgrund dieser bisherigen Untersuchungen sind folgende Aussagen möglich:

Aktivität A ist nur im sauren pH-Bereich aktiv (pH 4 - 5).

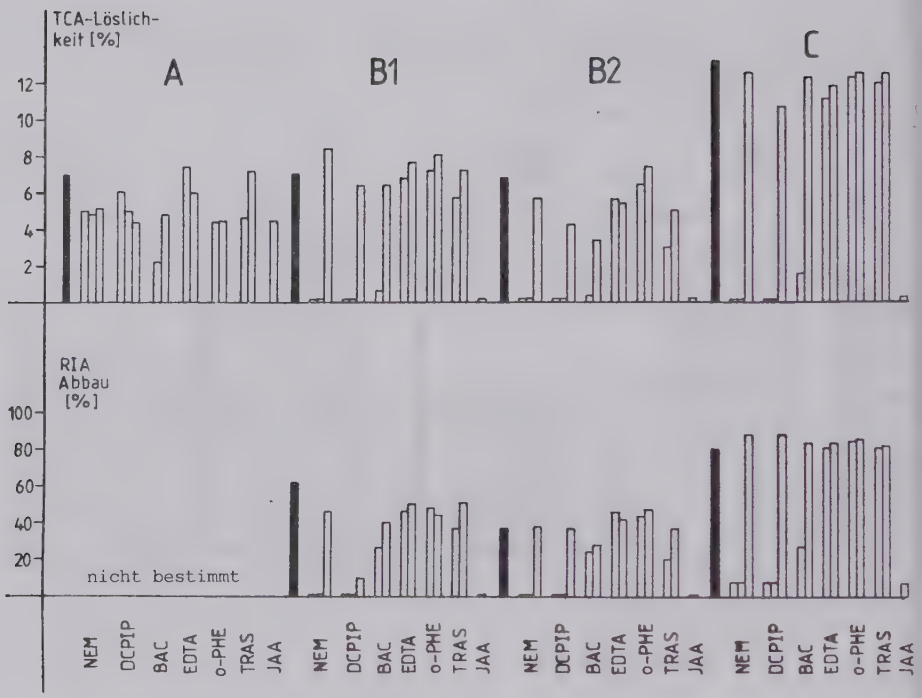


Abbildung 8: Inhibierbarkeit der Insulinabbauaktivität A, B1, B2 und C.

Inkubationsansatz wie in Abbildung 7. Die Ionen wurden durch entsprechende Inhibitoren ersetzt. Vor Zugabe von CT125J-Insulin und GSH wurde die Insulinabbauaktivität mit Inhibitor 5 min vorinkubiert. Nach Inkubation wurde die TCA-Löslichkeit und Immunreaktivität bestimmt (4.7.1./2.) Die schwarzen Säulen entsprechen dem Insulinabbau der Abbauaktivitäten ohne Inhibitor.

Inhibitorkonzentrationen (mM im Ansatz):

N-Ethylmaleimid	(NEM)	3,3	1,1	0,1
2,6-Dichlorphenol-Indophenol	(DCPIP)	10,0	1,0	0,1
Bacitracin	(BAC)	3,0	0,5	
EDTA		10,0	1,0	
o-Phenanthrolin	(o-PHE)	3,0	1,0	
Trasylol*	(TRAS)	2000,0	400,0	
Jodacetamid	(JAA)	30,0		

Als Säulen mit fallender Konzentration von links nach rechts dargestellt.

* KIE = Kallikrein-Inaktivator-Einheit

Sie ist weder durch Ionen (Ca, Mg, Mn, Cu, Zn) oder GSH aktivierbar, noch durch Komplexbildner (EDTA, o-Phe) oder SH-Blocker (NEM, JAA) inhibierbar. Nur Bacitracin zeigt in hoher Konzentration (3 mM im Ansatz) einen inhibierenden Effekt.

Die Aktivitäten B1, B2 und C sind nicht durch Ionen aktivierbar und zeigen keine Abhängigkeit gegenüber Komplexbildnern. Cu und Zn, sowie SH-Blocker inhibieren den Insulinabbau vollständig, wenn sie im Überschuß gegenüber SH-Reagenzien (GSH) eingesetzt werden. Durch Vorinkubation mit SH-Blocker und anschließender Zugabe von GSH (3-facher Überschuß) ist keine Hemmung der Aktivität B1, B2 und C möglich (Abb. 8). Unter der Annahme, daß die Insulinabbauaktivität freie SH-Funktionen im aktiven Zentrum zur Insulinabbaureaktion benötigt, läßt sich daraus schließen, daß diese für SH-Blocker nicht ohne weiteres zugänglich ist (159). Hierfür gibt es zwei mögliche Erklärungen:

a) Die Abbauaktivität kann z. B. in der oxidierten Form (S-S-Brücken) vorliegen und wird erst durch Zugabe von GSH in die aktive, reduzierte SH-Form überführt.
b) Die aktiven SH-Funktionen können vom Inhibitor nicht erreicht werden, was durch die Konformation der Abbauaktivität bedingt sein kann. Zugabe von GSH kann eine Konformationsänderung mit sich bringen und macht dadurch die SH-Funktionen zugänglich.

In diesem Fall würde der SH-Blocker nicht die SH-Funktionen des Enzyms, sondern andere SH-Funktionen, wie die des GSH blockieren.

Im vorliegenden Fall wurden alle Abbautests mit GSH im Inkubationsansatz durchgeführt und die Aktivitäten B1, B2 und C zeigten gleiches Verhalten. Ohne GSH im Ansatz war für B1 und B2 der Insulinabbau erniedrigt und für C konnte kein Insulinabbau gemessen werden. Mit und ohne GSH im Ansatz wurden für B1 und B2 gleiche Effekte gemessen. Dies

spricht wiederum für die SH-Abhängigkeit der Insulinabbauaktivitäten B1, B2 und C (vgl. 5.2.).

Durch Bacitracin wurden die Insulinabbauaktivitäten B1, B2 und C nicht vollständig gehemmt (Abb. 8 RIA).

Unter den hier verwendeten Bedingungen ist der Abbau von Insulin durch GSH gering (1 % TCA-Löslichkeit, 5 % RIA-fällbar) und wurde bei der Leerwertkorrektur (4.7.1./2.) berücksichtigt.

5.3.1.2. Vergleich der Insulinabbauaktivität von Aufarbeitungsstufen verschiedener Leberpräparationen

Bei vier verschiedenen Leberpräparationen wurden auf verschiedenen Stufen der Aufarbeitung Aliquots entnommen und deren Abbauaktivität gegenüber 125J-Insulin mittels TCA-Fällung und RIA getestet. Weiterhin wurde der Proteingehalt der einzelnen Proben bestimmt. Die erhaltenen Werte sind in Tabelle 2 zusammengestellt. Die tabellarische Zusammenstellung läßt folgende Aussagen zu:

a) Der durch TCA-Fällung bestimmte Insulinabbau liegt im Vergleich zum gemessenen Insulinabbau, mittels RIA bestimmt, immer niedriger.
b) Die Abbauaktivität ist wasserlöslich und befindet sich zum Großteil im XADEÜ.
c) Auf allen Aufarbeitungsstufen fungiert GSH als Aktivator.
d) Der Einsatz von nat. Insulin vermindert den 125J-Insulinabbau (vgl. 5.2.).

Die Abbauaktivitäten B1, B2 und C sind von der Verdünnung her nicht mit den anderen Aufarbeitungsstufen (LM, LME, XADEÜ, XADEP) vergleichbar. Insulinabbau durch GSH vgl. 5.3.1.1..

Aufarbeitungsstufen der Abbauaktivität

		LM	LME	XADEÜ	XADEP	B1	B2	C
Protein gesamt (mg)	1	364	225	126	36	1,6	1,7	1,9
	2	372	352	165	81	2,0	1,6	2,1
	3	744	543	239	144	1,6	1,8	1,5
	4	716	572	383	121	0,9	0,7	3,0
Abbau % TCA-F	1	40,3	36,9	17,1	0,6	12,0	23,3	2,7
	2	34,5	37,9	10,5	0,0	6,4	15,7	1,9
	3	35,4	39,0	20,9	9,0	14,8	14,0	0,0
	4	47,8	56,5	31,9	3,5	20,4	42,0	6,3
Abbau % TCA-F + GSH	1	47,2	38,4	23,7	3,5	20,5	45,4	13,6
	2	40,8	40,2	22,0	0,6	32,0	41,8	22,2
	3	36,3	40,0	27,2	10,1	31,1	29,9	28,0
	4	50,0	60,8	33,0	6,9	37,9	56,0	29,1
Abbau % TCA-F + GSH + nat. I.	1	24,0	26,2	13,3	2,8	14,1	28,8	17,3
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	29,1	32,0	16,5	8,0	20,0	17,4	13,8
	4	21,1	18,0	16,0	1,3	8,4	2,2	22,3
Abbau (%) RIA	1	66,2	70,5	34,2	0,0	14,0	70,9	9,1
	2	63,8	62,3	16,6	0,0	31,4	62,2	8,5
	3	48,7	71,4	51,6	26,7	57,6	78,4	3,5
	4	76,3	90,9	51,7	4,0	58,5	96,0	16,5
Abbau (%) RIA + GSH	1	83,1	80,1	57,4	14,1	54,6	92,3	74,0
	2	72,3	69,9	34,0	0,0	87,4	72,0	83,2
	3	74,5	75,3	63,3	37,0	84,0	84,1	53,6
	4	90,5	97,3	75,4	10,8	62,0	94,9	96,5

Tabelle 2: Aufarbeitungsstufen der Insulinabbauaktivitäten aus Rattenlebermikrosomen. Vier verschiedene Aufarbeitungen von Rattenlebern wurden gegenübergestellt.

1. Aug. 1981 20 Ratten, 86 g Leber
2. Dez. 1982 20 Ratten, 76 g Leber
3. Dez. 1982 21 Ratten, 125 g Leber
4. Jul. 1983 21 Ratten, 114 g Leber

Die einzelnen Stufen wurden wie unter 4.8./5.2. beschrieben gewonnen.

Inkubationsansatz:
Die Proben der Aufarbeitungsstufen LM/LME/XADEÜ/XADEP wurden auf ein Volumen eingestellt, die einem Lebermikrosomenextrakt 0,1 % an Triton (LME 1:15) vergleichbar sind. Die Spitzenfraktionen des DEAE-Sepadex A50-Säulenlaufes wurden unverdünnt eingesetzt (Aktivität B1, B2 und C).
50 000 cpm CT125J-Insulin in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton oder 0,1 M KNaPP, pH 7,4/0,03 % Triton (Tris/HCl o KNaPP)
\+ 50 µl Probe
+/- 10 µl GSH 20 mM
+/- 10 µl nat. Insulin 1 mg/ml
\+ Tris/HCl oder KNapp ad 250 µl
Es wurde 60 min bei + 30° C inkubiert und wie unter 4.7.1./2 verfahren.

5.3.2. Gelchromatographie von 125J-Insulin und 125J-Insulinabbauprodukten an Sephadex G50 fine

5.3.2.1. Vergleich verschiedener 125J-Insuline

Wie bereits in der Literatur beschrieben (62, 112-116, 168, 169), stellt Chloramin T-jodiertes Insulin ein sehr uneinheitliches Jodierungsprodukt dar. Insulin enthält vier Tyrosine (A14, A19, B16 und B26), die einfach oder zweifach substituiert werden können.

In Abbildung 9 A sind die Elutionsprofile von frischem Chloramin T-jodiertem Rinderinsulin (CT-125J-Isulin) und mit Lactoperoxidase jodiertem monokomponentem Schweineinsulin (125J-A14-Insulin) dargestellt. Abbildung 9 B zeigt die gleichen 125J-Insuline nach 30 Tagen Lagerung.

Vergleicht man das Elutionsprofil von CT-125J-Insulin (4.2.1. Abb. 1) mit dem Elutionsprofil in Abb. 9 A/B, so sieht man, daß mit K-Na-Phosphatpuffer als Elutionspuffer CT-125J-Insulin einen Insulinhauptpeak besitzt, während mit Essigsäure als Elutionspuffer das CT-125J-Insulin in zwei Haupt-Peaks aufgetrennt wurde. Außerdem entstehen beim CT-125J-Insulin während der Lagerung bei - 30° C Autoradiolyseprodukte, die im Ausschlußvolumen und Bereich des Salzpeaks (Abb. 9 B) eluiert wurden, welche bei 125J-A14-Insulin nicht entstehen. Auch die Immunreaktivität des 125J-A14-Insulins verändert sich nur unwesentlich während der Lagerung bis zu 30 Tagen, während das CT-125J-Insulin dann nur noch zu 60 % immunreaktiv und bis zu 15 % TCA-löslich ist (100, 127).

Aufgrund dieser Ergebnisse und deren Bestätigung durch PAGE (5.8.1.) wurde für alle weiteren Untersuchungen des Insulinabbaues das CT-125J-Insulin durch 125J-A14-Insulin ersetzt.

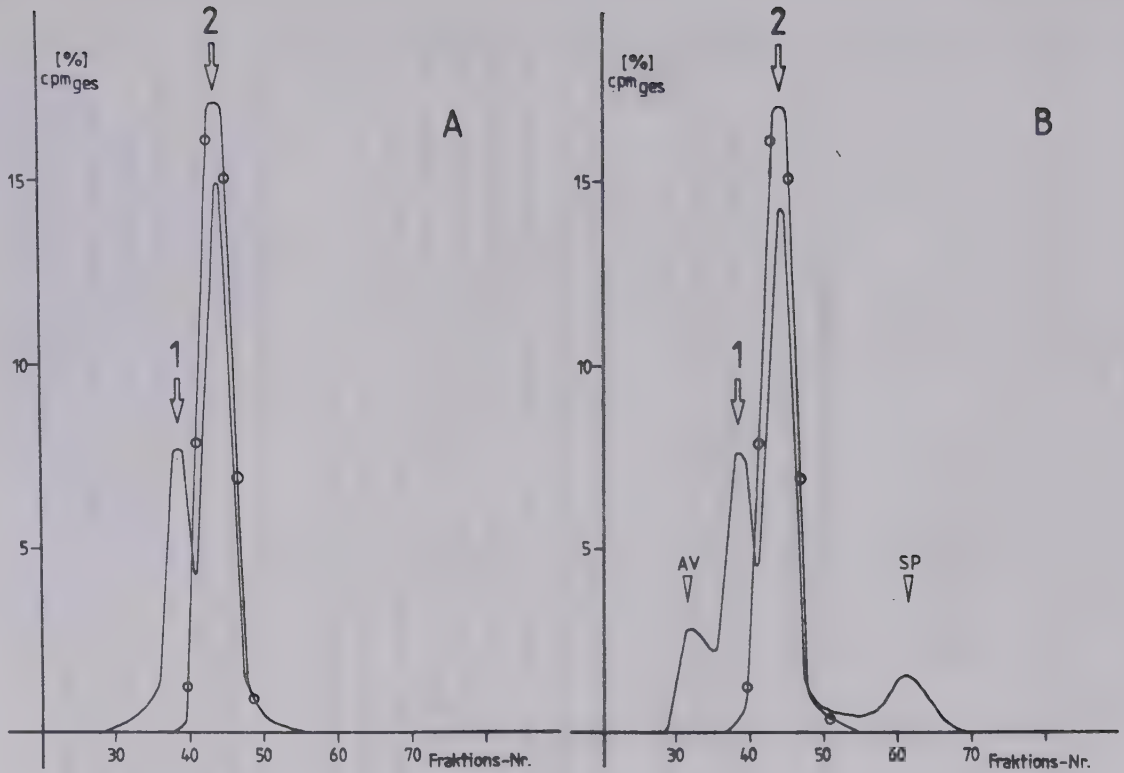

[%]
cpm ges
A
2
1
15
10
5
30
40
50
60
70
Fraktions-Nr.
[%]
cpm ges
B
2
1
AV
SP
15
10
5
30
40
50
60
70
Fraktions-Nr.

Abbildung 9:

Abbildung 9: Gelfiltration von CT-125J-Insulin und 125J-A14-Insulin an Sephadex G50 fine. Die 125J-Insuline wurden direkt nach der Präparation und nach 30 Tagen Lagerung bei - 30° C chromatographiert. Es wurden 50 000 cpm je Säulenlauf aufgetragen und nach 4.7.3. verfahren.

——— CT-125J-Insulin Rind
-o-o- 125J-A14-Insulin Schwein

9 A: Säulenchromatographie direkt nach der Präparation
9 B: Säulenchromatographie nach 30 Tagen Lagerung bei - 30° C

1 = Insulinhauptpeak 1
2 = Insulinhauptpeak 2
AV = Ausschlußvolumen
SP = Salzpeak

5.3.2.2. Einfluß der Lagerung auf Lebermikrosomen und Lebermikrosomenextrakte

Die Gelchromatographie von 125J-Insulin nach Einwirkung von Insulinabbauaktivität läßt Aussagen über die Größe der entstandenen Insulinabbaubruchstücke zu (18, 49).

In Abbildung 10 und 11 sind die Insulinabbauprofile von Lebermikrosomen (LM) und Lebermikosomenextrakt (LME) dargestellt. Um den Einfluß der Lagerung auf die Abbauaktivitäten in LM und LME zu ermitteln, wurden Abbauuntersuchungen direkt nach der Präparation und nach 30 Tagen Lagerung von LM und LME bei - 30° C durchgeführt. Der Insulinabbau wurde unter den Bedingungen $\pm$ GSH $\pm$ nat. Insulin bestimmt. In den Legenden der Abbildung 10 und 11 sind diese Insulinabbaubedingungen mit A - D bezeichnet.

Vergleich der Elutionsprofile von LM, direkt nach der Präparation bestimmt, unter den Insulinabbaubedingungen A - D (Abb. 10): Unter Bedingung A weist das Elutionsprofil von LM vier Peaks auf, die über den gesamten Fraktionsbereich verteilt sind. Die Größe der Abbaubruchstücke nimmt mit steigender Fraktionsnummer ab. Demnach sind hauptsächlich niedermolekulare Insulinabbaubruchstücke nachweisbar.

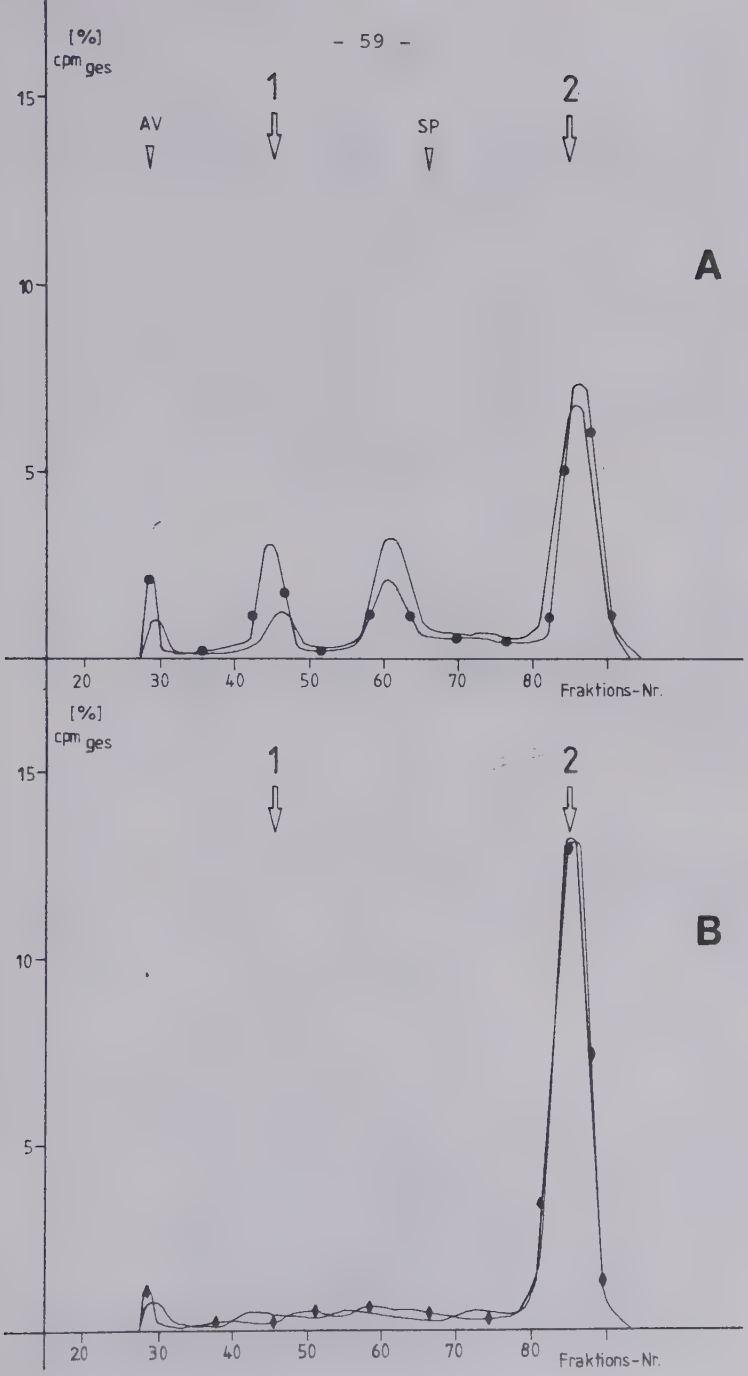


Abbildung 10:

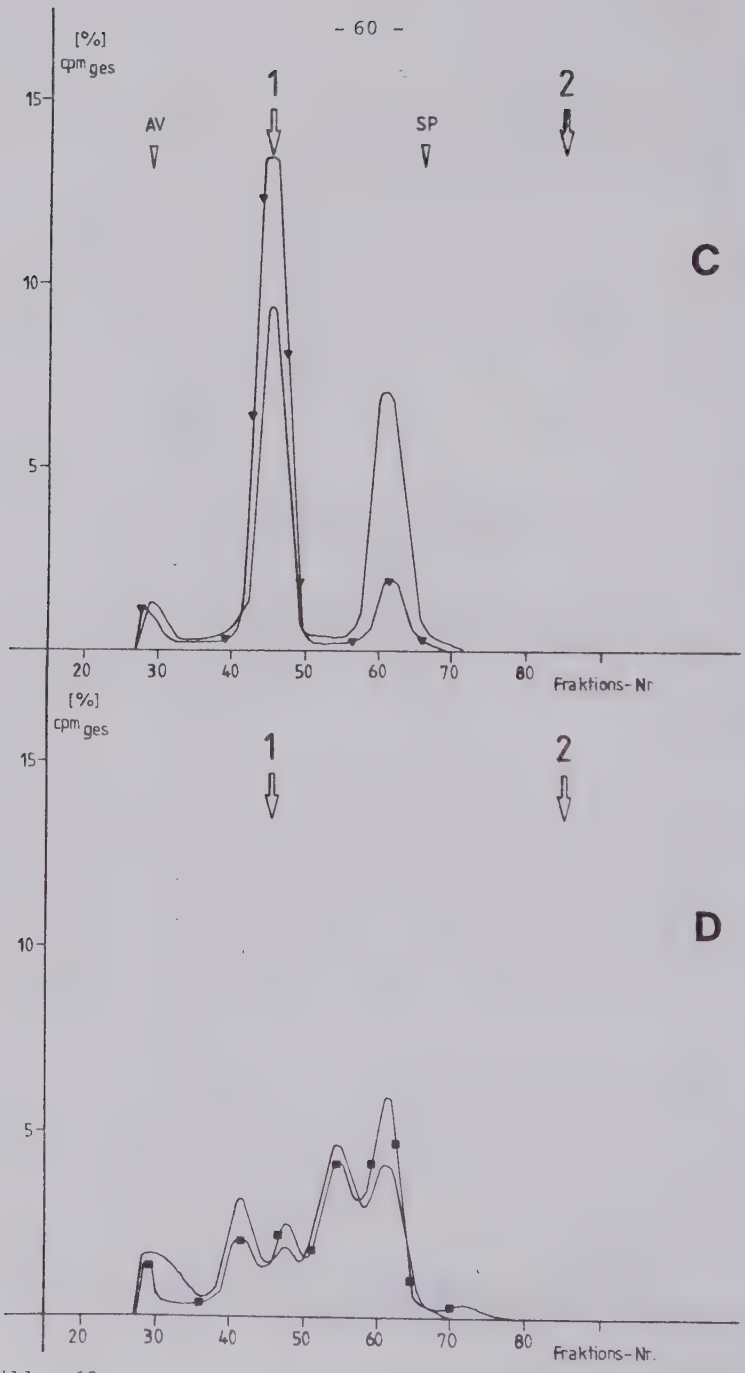


Abbildung 10:

Unter Bedingung B entstehen im Vergleich zu A nur noch Abbauprodukte im niedermolekularen Bereich (J-Tyrosin-Peak). Unter Bedingung C werden die Abbauprodukte im Vergleich zu A, zu höhermolekularen Abbauprodukten verschoben, wobei der 125J-Insulinpeak den Hauptpeak darstellt.
Unter Bedingung D entstehen ebenfalls nur höhermolekulare Abbauprodukte. Im Vergleich zu D ist fast kein 125J-Insulin mehr vorhanden und es entstehen zwei zusätzliche Peaks. Demnach ist unter Bedingung B und D der Insulinabbau aktiviert und unter Bedingung C und D treten keine niedermolekularen Insulinabbauprodukte auf.

Abbildung 10: Gelfiltration von 125J-Insulin nach Abbau durch Lebermikrosomen (LM) an Sephadex G50 fine, direkt nach der Präparation der LM und nach deren Lagerung bei - 30° C. Die Gelchromatographie erfolgte nach 4.7.3..

Inkubationsansatz:

50 000 cpm 125J-A14-Insulin (Schwein) in 0,1 M KaPP, pH 7,4/ 0,03 % Triton (KNaPP/Triton)
\+ 50 µl LM
+/- 10 µl nat. Insulin, 1mg/ml
+/- 10 µl GSH, 10 mM
\+ KNaPP/Triton ad 250 µl

Die Proben wurden 60 min. bei + 30° C inkubiert und weiter wie unter 4.7.3. verfahren. Die LM wurden auf ein Volumen eingestellt, die einem LME 0,1 % an Triton (LME 1÷15) vergleichbar sind.

1 = 125J-A14-Insulin-Peak
2 = J-Tyrosin-Peak
AV = Ausschlußvolumen
SP = Salzpeak

Der Abbau wurde getestet mit:
10 A: 125J-A14-Insulin
10 B: 125J-A14-Insulin + GSH (0,4 mM)
10 C: 125J-A14-Insulin + nat. Insulin (7 µM)
10 D: 125J-A14-Insulin + GSH + nat. Insulin (400/7 µM)

Die Elutionsprofile ohne Markierung (————) entsprechen den 125J-Insulinabbauprodukten direkt nach der Präparation von LM.
Die Elutionsprofile mit Markierung entsprechen den 125J-Insulinabbauprodukten nach 30 Tagen Lagerung der LM bei - 30° C.

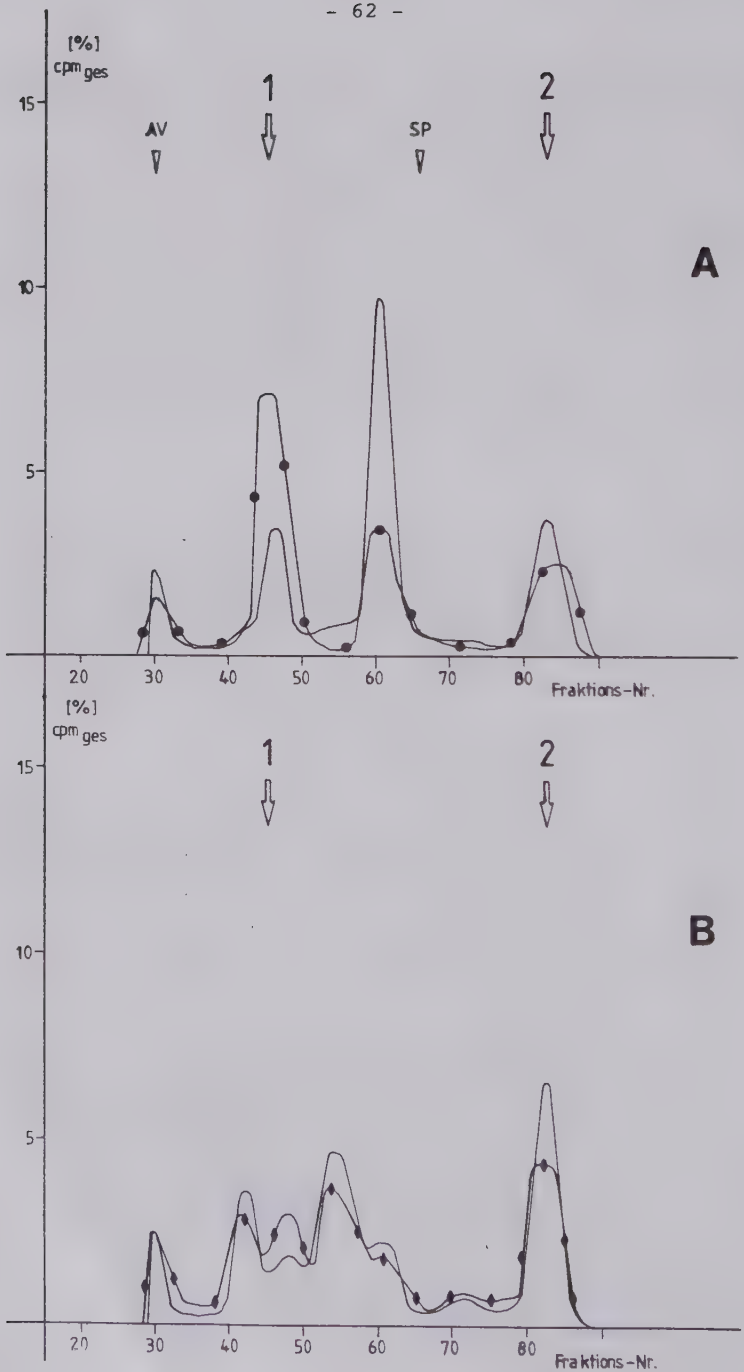


Abbildung 11:

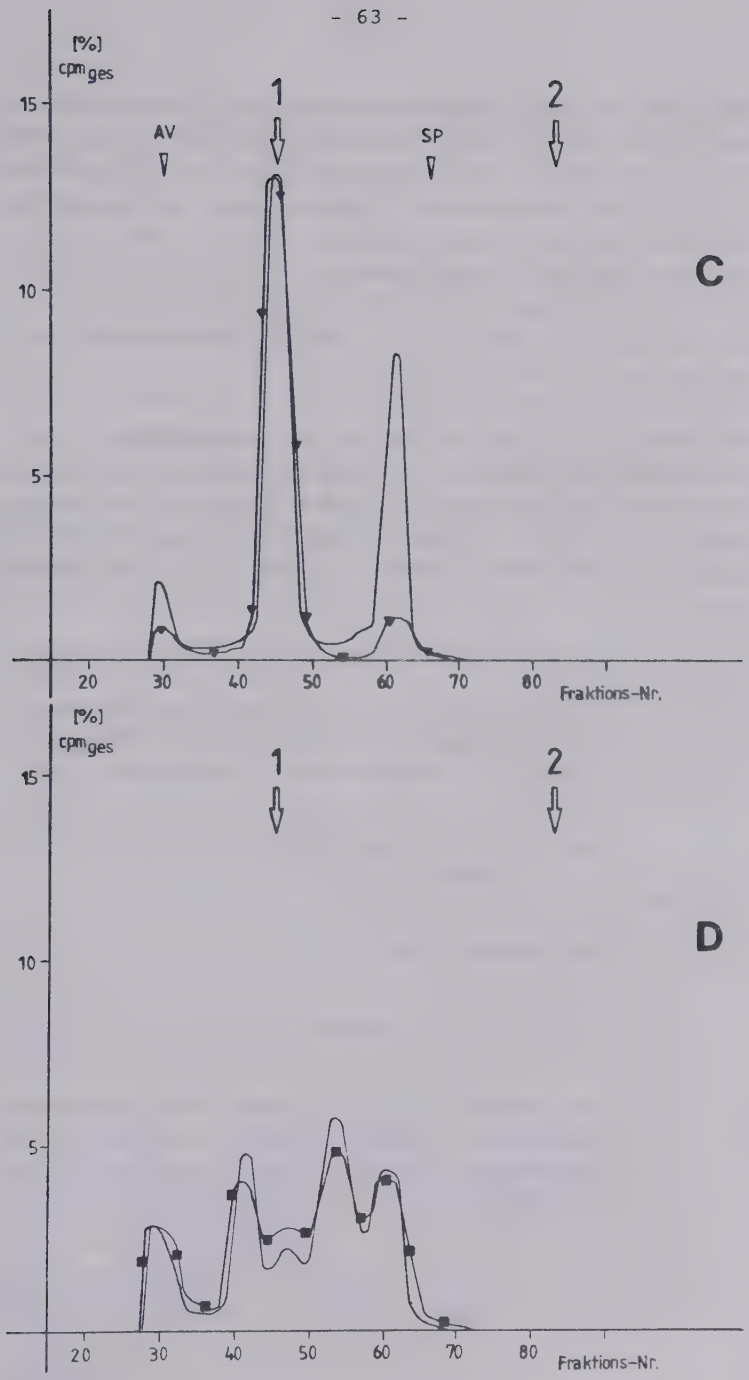


Abbildung 11:

Vergleich der Elutionsprofile von LM nach Lagerung und direkt nach der Präparation unter gleichen Inkubationsbedingungen (Abb. 10 A - D): Unter Bedingung A und C ist nach Lagerung eine Verschiebung zu höhermolekularen Abbauprodukten zu beobachten. Unter Bedingung B und D erhält man vor und nach Lagerung gleiche Abbauprofile.

Die für die LM beschriebenen Aussagen treffen ebenfalls für die LME zu (Abb. 11 A - D).

Die nach Lagerung der LM und LME, unter Bedingung A und C, auftretende Verschiebung der Insulinabbauprodukte zu höhermolekularen Bruchstücken, die unter Bedingung B und D aufgehoben ist, weist auf einen Verlust an Aktivator hin (freie SH-Funktionen). Ein Verlust an Abbauaktivität ist nicht feststellbar.

Abbildung 11: Gelfiltration von 125J-Insulin nach Abbau durch Lebermikrosomenextrakt (LME) an Sephadex G50 fine, direkt nach der Präparation des LMEes und nach dessen Lagerung bei - 30° C. Die Gelchromatographie erfolgte nach 4.7.3..

Der Inkubationsansatz entspricht dem aus Abbildung 10. Die LM wurden durch LME ersetzt. Der LME wurde so verdünnt, daß er 0,1 % an Triton (LME 1:15) war.

1 = 125J-A14-Insulin-Peak
2 = J-Tyrosin-Peak
AV = Ausschlußvolumen
SP = Salzpeak

Der Abbau wurde getestet mit:

11 A: 125J-A14-Insulin
11 B: 125J-A14-Insulin + GSH (0,4 mM)
11 C: 125J-A14-Insulin + nat. Insulin (7 µM)
11 D: 125J-A14-Insulin + GSH + nat. Insulin (400/7 µM)

Die Elutionsprofile ohne Marierung (————) entsprechen den 125J-Insulinabbauprodukten direkt nach der Präparation von LME.
Die Elutionsprofile mit Markierung entsprechen den 125J-Insulinabbauprodukten nach 30 Tagen Lagerung der LMEe bei - 30° C.

Der Vergleich der Elutionsprofile von LM und LME unter gleichen Inkubationsbedingungen wird im folgenden Kap. (5.3.2.3.) besprochen.

5.3.2.3. Elutionsprofile nach Abbau von 125J-A14-Insulin durch Abbauaktivität aus Aufarbeitungsstufen der Lebermikrosomen

Die Elutionsprofile von 125J-A14-Insulin nach Inkubation mit LM, LME, XADEÜ, den Aktivitäten A, B1, B2 und C sind in den Abbildungen 12 - 18 dargestellt. Die Inkubationsbedingungen entsprechen denen im Abschnitt 5.3.2.2., mit A - D bezeichnet. Zur anschaulichen Beschreibung und Zuordnung der einzelnen Peaks der unterschiedlichen Elutionsdiagramme wurde folgendes Schema erstellt:

Peak 1 = Fraktion 30 = Ausschlußvolumen
Peak 2 = Fraktion 35
Peak 3 = Fraktion 40
Peak 4 = Fraktion 45 = 125J-A14-Insulin
Peak 5 = Fraktion 55
Peak 6 = Fraktion 60/61
Peak 7 = Fraktion 72/73
Peak 8 = Fraktion 84/85 = J-Tyrosin
Der Salzpeak liegt im Bereich der Fraktion 65/66

Durch die Solubilisierung von Lebermikrosomen ergeben sich zwei Fragen:

a) Zerstörung der Membranordnung
b) Denaturierung von Proteinen

Beide Faktoren können ein verändertes Abbauverhalten von Insulin durch Insulinabbauaktivitäten bedingen. Der Vergleich der Insulinabbauprofile von LM, LME und XADEÜ (Abb. 12 -14) soll Hinweise geben, ob durch die oben genannten Faktoren, während der Aufarbeitung Abbauaktivität verloren geht. Proben von LM, LME und XADEÜ wurden auf gleiche Volumina eingestellt und sind somit bei allen Insulinabbau-

untersuchungen direkt miteinander vergleichbar.

Der Vergleich der Insulinabbauprofile der Insulinabbauaktivitäten A, B1, B2 und C soll Hinweise geben, ob es sich hier um unterschiedliche Abbauaktivitäten handelt.

Einfluß der Aufarbeitung und der Inkubationsbedingungen auf die Abbauprofile von LM, LME und XADEÜ (Abb. 12 -14): Unter Inkubationsbedingung A und B entstehen bei allen drei Aufarbeitungsstufen niedermolekulare Abbauprodukte. Mit fortschreitender Aufarbeitung entstehen unter Bedingung A weniger niedermolekulare Abbauprodukte. Unter Bedingung B ist der Insulinabbau gegenüber Bedingung A bei allen drei Aufarbeitungsstufen erhöht. Es entstehen keine niedermolekularen Insulinabbauprodukte unter Bedingung C und D. Unter Bedingung C entstehen entsprechend Bedingung A mit fortschreitender Aufarbeitung weniger niedermolekulare Abbauprodukte. Unter Bedingung D ist der Insulinabbau im Vergleich zu C (entsprechend B) für alle Aufarbeitungsstufen erhöht. Es entstehen hier, im Gegensatz zu Bedingung B für alle drei Aufarbeitungsstufen die gleichen Elutionsprofile.

LME und XADEÜ enthalten unter Bedingung A und D alle Peaks (Bed. A: 1, 4, 6 und 8, Bed. D: 1, 3, 4, 5 und 6), die auch durch LM erzeugt werden, was gegen den Verlust einer der enthaltenen Abbauaktivität spricht. Mit fortschreitender Aufarbeitung tritt eine Umverteilung der Insulinabbaubruchstücke zu höhermolekularen Produkten auf (Bed. A, B und C). Dies ist durch den Verlust an Gesamtabbauaktivität erklärbar. Dem wiederspricht allerdings die vollständige Reaktivierbarkeit der Abbauaktivität unter Bedingung D für alle drei Aufarbeitungsstufen.

GSH aktiviert den Insulinabbau (Bed. B und D) in allen drei Aufarbeitungsstufen, während nat. Insulin die Ent-

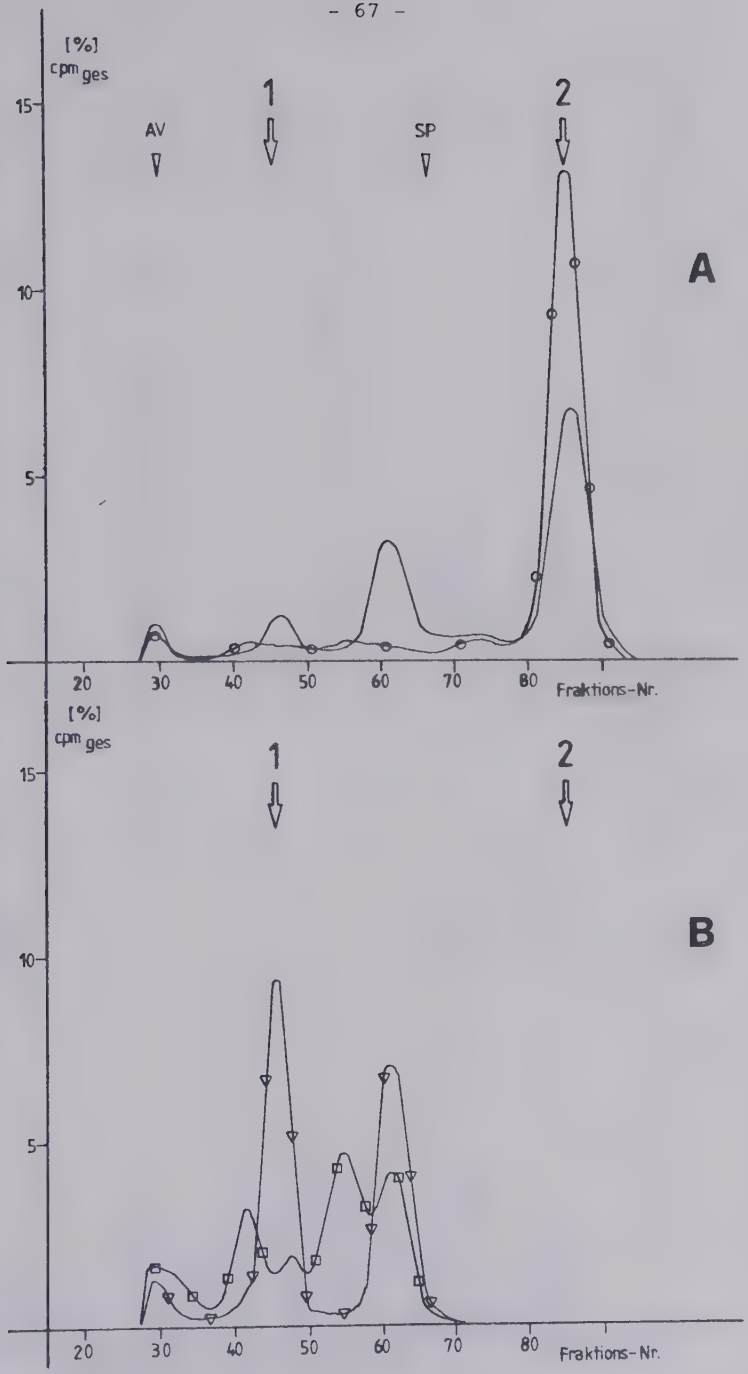


Abbildung 12:

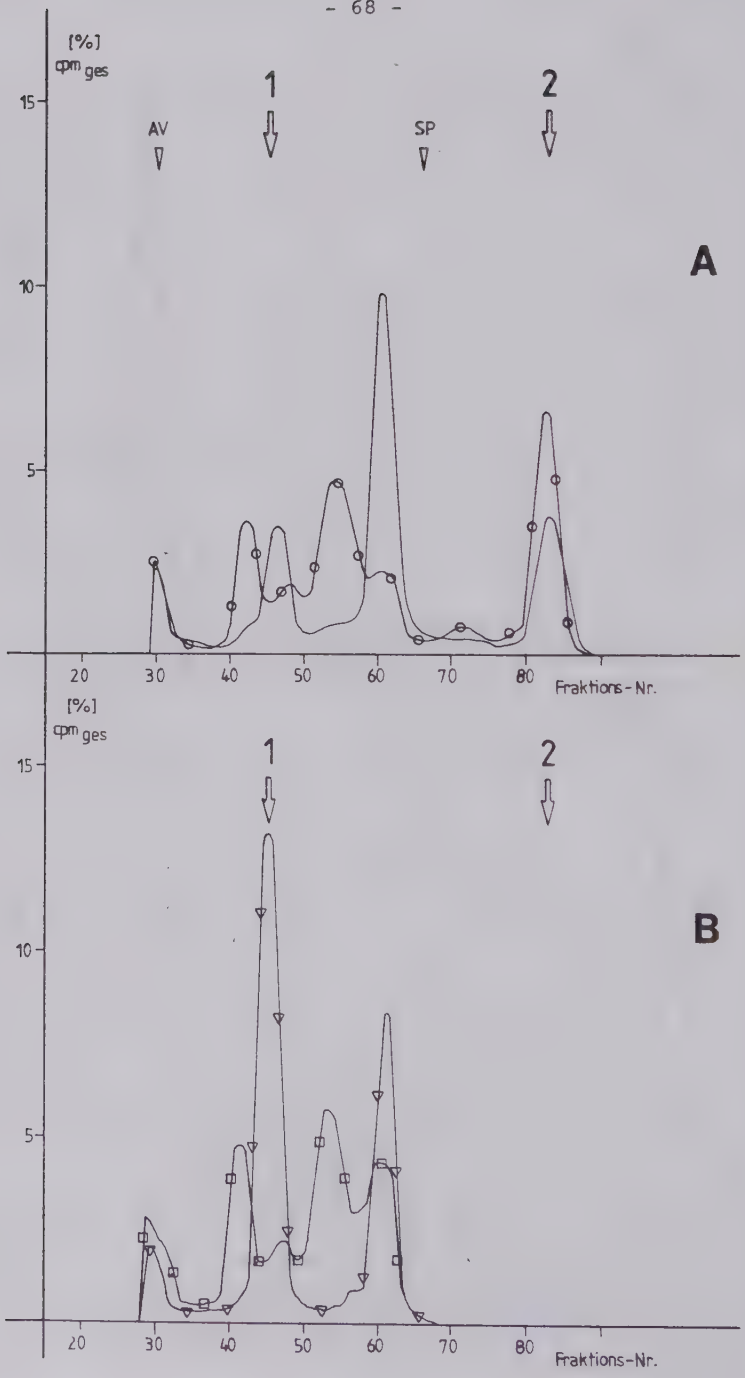


Abbildung 13:

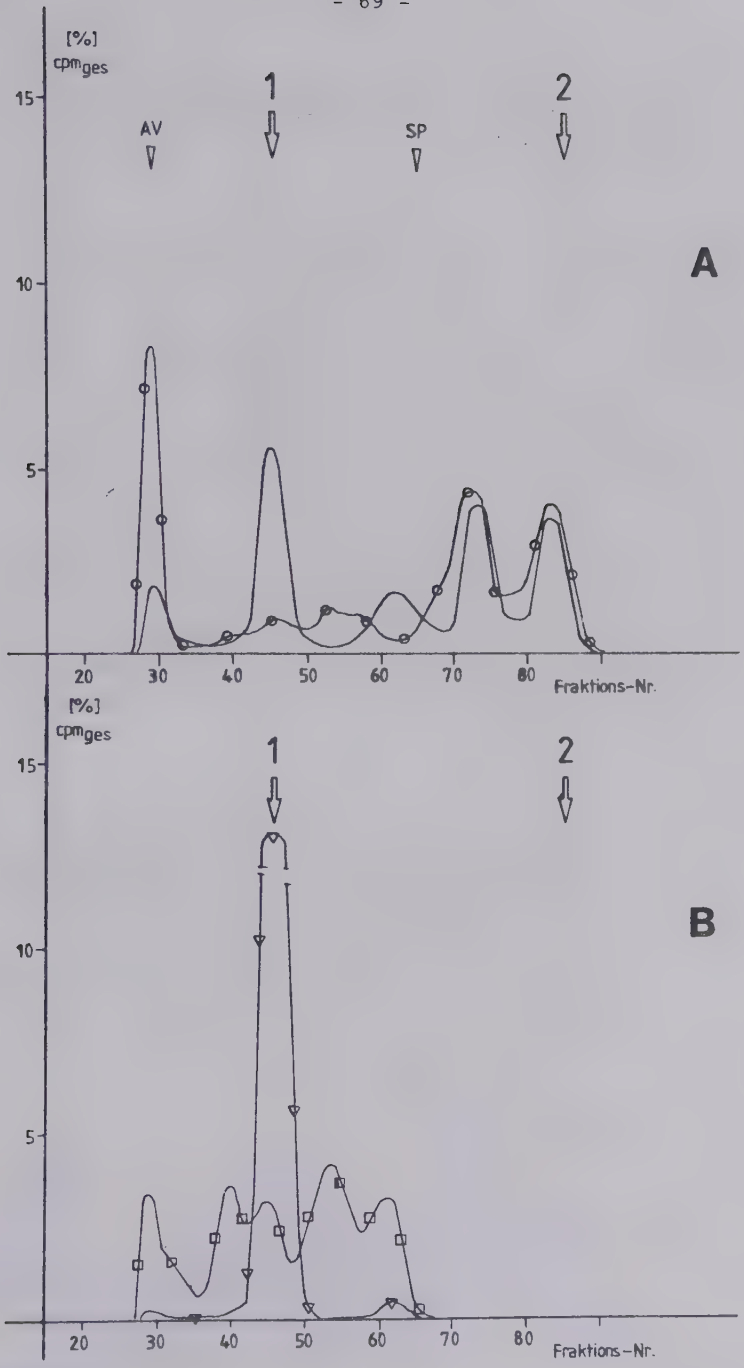


Abbildung 14:

stehung niedermolekularer Insulinabbauprodukte (Bed. C und D) verhindert, was die in 5.2. und 5.3.1.2. erhaltenen Ergebnisse bestätigt.

Vergleich der Insulinabbauprofile der Aktivitäten A, B1, B2 und C (Abb. 15 - 18): Abbildung 18 zeigt das Abbauprofil von Aktivität A. Sie ist weder Ionen- (5.3.1.1.) noch GSH-abhängig und ist nur im sauren pH-Bereich (pH 4 - 5) aktiv. Mit nat. Insulin im Reaktionsansatz treten keine Insulinabbauprodukte auf. Diese Merkmale unterscheidet die Insulinabbauaktivität A von den drei Abbauaktivitäten B1, B2 und C. Unter Bedingung A - D erhält man mit Aktivität B1 (Abb. 15) die Peaks 1, 2, 4, 6 und 7 in unterschiedlicher Größe. Unter Bedingung B ist der Abbau am größten, es folgen die Bedingungen A und D mit niedrigerem Insulinabbau und unter Bedingung C ist fast kein Abbau mehr meßbar. Die Aktivität B2 (Abb. 16) verhält sich unter Bedingung A und C wie die Aktivität B1. Unter Bedingung B und D entsteht ein Elutionsprofil ähnlich dem von LME mit den Peaks

Abb. 12 - 17: Gelfiltration der 125J-Insulinabbauprodukte von Insulinabbauaktivität der Proben aus Aufarbeitungsstufen von Lebermikrosomen (LM, LME, XADEÜ, Aktivität B1, B2 und C), an Sephadex G50 fine. Die Gelchromatographie erfolgte nach 4.7.3.. Die Indubationsbedingungen entsprechen denen aus Abbildung 10.

LM,LME und XADEÜ wurden auf Volumina eingestellt, die einem LME, 0,1 % an Triton (LME 1:15),vergleichbar sind. Die Aktivitäten B1, B2 und C wurden unverdünnt eingesetzt.

1 = 125J-A14-Insulin-Peak
2 = J-Tyrosin-Peak
AV = Ausschlußvolumen
SP = Salzpeak

Der Abbau wurde getestet mit: Inkubationsbedingung

12-17 A: 125J-A14-Insulin — A
125J-A14-Insulin + GSH (0,4 mM) — B
12-17 B: 125J-A14-Insulin + nat. Insulin (7 µM) — C
125J-A14-Insulin + GSH + nat. Insulin (400/7 µM) — D

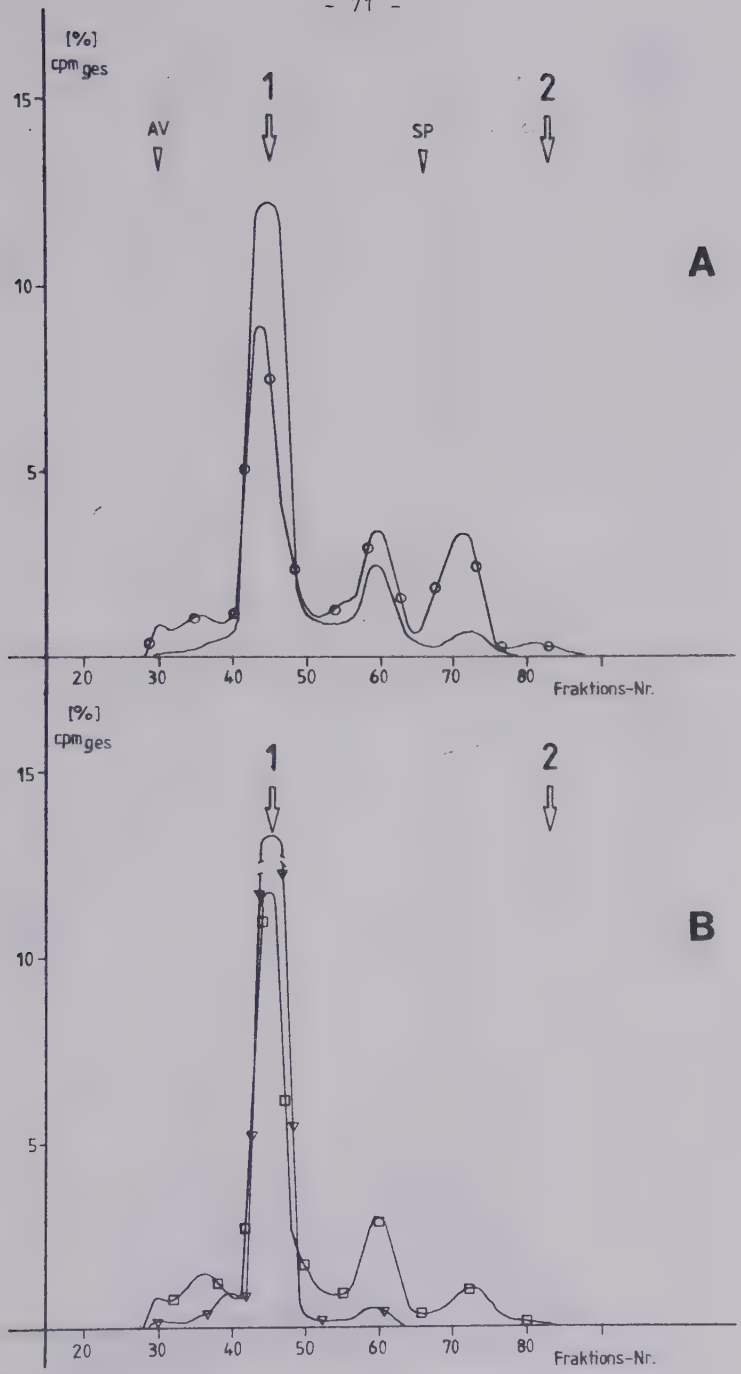


Abbildung 15:

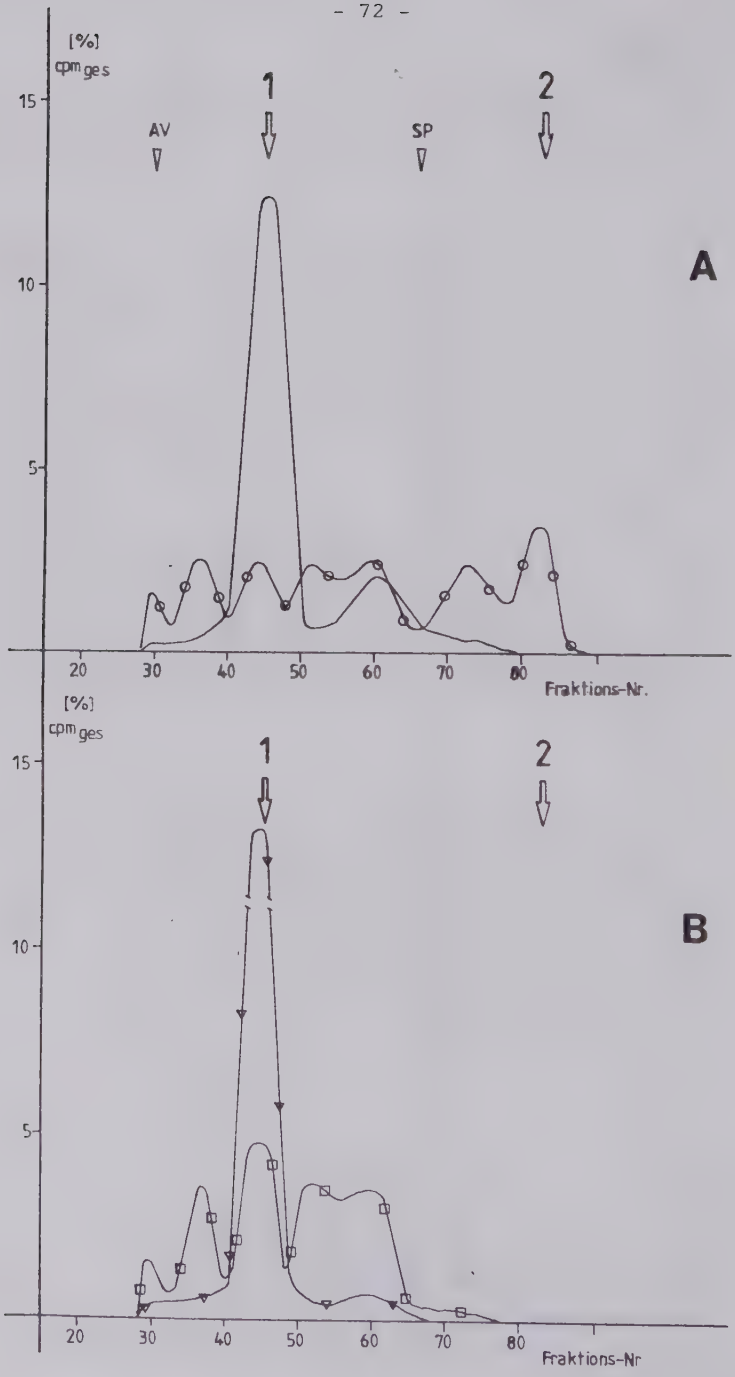
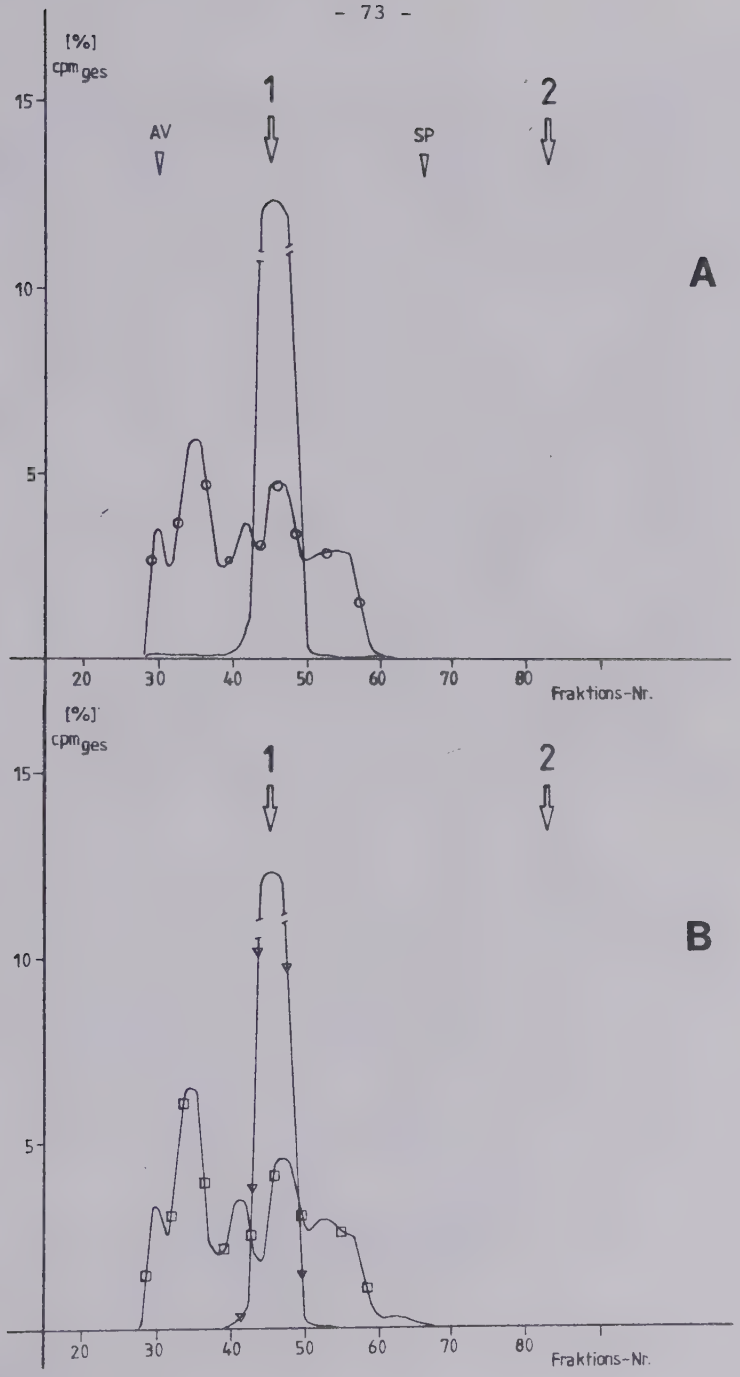


Abbildung 16:



. Abbildung 17:

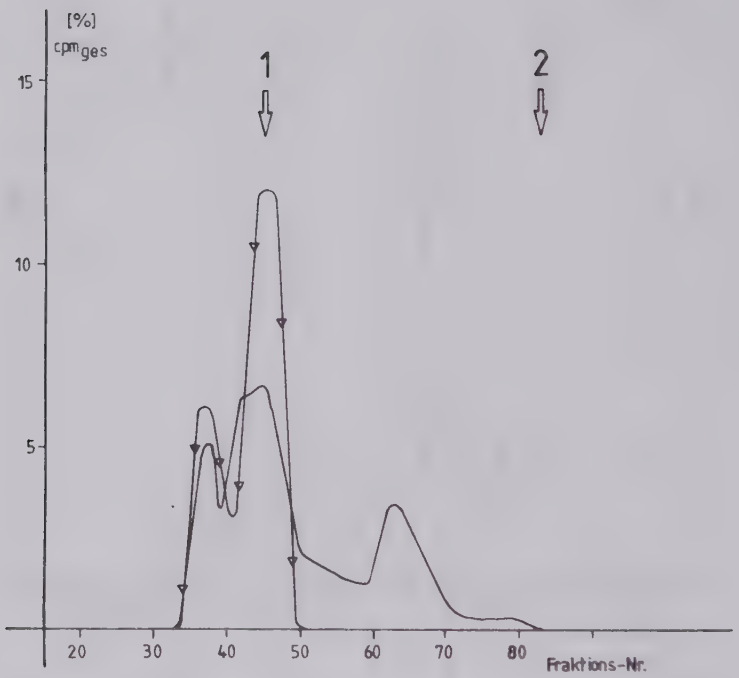


Abbildung 18: Gelfiltration der 125J-Insulinabbauprodukte von Insulinabbauaktivität A, an Sephadex G50 fine. Die Gelchromatographie erfolgte nach 4.7.3.

Inkubationsansatz:

50 000 cpm CT-125J-Insulin Rind, in 0,1 M NaAc ,pH 4,5/ 0,03 % Triton (NaAc)
\+ 50 µl Aktivität A
+/- 10 µl GSH 10 mM
+/- 10 µl nat. Insulin, 1 mg/ml
\+ NaAc ad 250 µl

Die Proben wurden 60 min bei + 30° C inkubiert, mit Harnstoff (8 M Endkonzentration) gestoppt und weiter wie unter 4.7.3. verfahren. Aktivität A wurde unverdünnt eingesetzt.

1 = CT-125J-Insulin-Hauptpeak 2 = 125J-A14-Insulin-Peak (vgl. Abb. 9)
2 = J-Tyrosinpeak

Der Abbau wurde getestet mit:

——— CT-125J-Insulin +/- GSH (0,4 mM)
-▽-▽- CT-125J-Insulin +/- GSH + mat. Insulin (400/7 µM)

1, 2, 4, 5, 6, 7 und 8 unter Bedingung B (vgl. Abb. 13) und den Peaks (1, 2, 4, 5 und 6 unter Bedingung D. Für Aktivität C (Abb. 17) ist unter Bedingung A und C kein Abbau meßbar. Unter Bedingung B und D erhält man gleiche Elutionsprofile mit den Peaks 1 - 5. Es entstehen keine niedermolekularen Produkte.

Die Aktivitäten B1 und B2 erzeugen mit GSH im Ansatz (Bed. B) niedermolekulare Insulinabbauprodukte, die mit nat. Insulin im Ansatz (Bed. C) nur bei Aktivität B1 auftreten. Aktivität C erzeugt keine niedermolekularen Produkte und ist GSH-abhängig. Es kann sich demnach bei den Aktivitäten B1, B2 und C um unterschiedliche Abbauaktivitäten handeln. Die Elutionsprofile von Aktivität B2 sind vergleichbar mit denen der Aktivität B1 (Bed. A) und des LMEes (Bed. B u.D). Dies ist ein Hinweis dafür, daß es sich um eine Mischung aus Aktivität B1 und C handeln kann (vgl. 5.2.). Die GSH-Aktivierbarkeit entsprechend 5.2. und 5.3.1.1. für diese drei Aktivitäten wurde bestätigt. Aktivität A ist weder Ionen- noch GSH-abhängig und nur im sauren pH-Bereich aktiv. Diese Merkmale unterscheidet sie von den Aktivitäten B1, B2 und C.

Inkubationen von GSH mit 125J-A14-Insulin oder CT-125J-Insulin entsprechend den Inkubationsbedingungen B und D zeigen keine Veränderungen im Elutionsprofil von 125J-A14-Insulin oder CT-125J-Insulin gegenüber den nicht behandelten 125J-Insulinen.

5.4. SDS-PAGE von Lebermikrosomen und deren Aufarbeitungsstufen

Zur Bestimmung der Aktivitätsanreicherung durch die Reinigungsschritte der Lebermikrosomenaufarbeitung wurden von den einzelnen Anreicherungsstufen Proteinbestimmungen und elektrophoretische Trennungen der Proteine durchgeführt. Die Werte der Proteinbestimmung sind aus Tabelle 2 (5.3.1.2.) zu ersehen. Nach der hier beschriebenen Präparationsmethode wurden aus durchschnittlich 100 g Rattenleber 500 mg mikrosomales Protein isoliert. Durch Tritonextraktion wurden ca. 390 mg Protein aus den Mikrosomen gewonnen, wovon ca. 50 % wasserlösliches Protein darstellt (210 mg Protein im XADEÜ). Nach Chromatographie an DEAE-Sephadex A50 enthalten die Spitzenfraktionen des Säulenlaufes mit Insulinabbauaktivität zwischen 1 und 2 mg Protein, was einer Gesamtmenge pro Aktivitätspeak von 8 - 12 mg entspricht. Unter der Annahme, daß keine Insulinabbauaktivität verloren geht, erhält man eine 50-fache Abbauaktivitätsanreicherung aus Lebermikrosomen nach der hier gewählten Aufarbeitungsmethode.

Mittels SDS-PAGE wurden die einzelen Proben der Aufarbeitungsschritte elektrophoretisiert, um zu zeigen welche Proteinbanden angereichert werden. Abbildung 20. zeigt zwei Gele, 7 - 14 % an Acrylamid. Es wurden die gleichen Proben aufgetragen, mit dem Unterschied, daß die Proben von Gel B reduziert wurden. Die reduzierten Proben ergaben andere Bandenmuster. Druch Reduktion der Proteine werden sämtliche intra- und intermolekulare S-S-Brücken gespalten, wodurch Protein in die kleinsten Untereinheiten zerlegt in der "Random-coil-Struktur" vorliegt. Dies bringt das veränderte Laufverhalten der Proteine in reduziertem Zustand, im Vegleich zum nicht reduzierten Zustand mit sich.

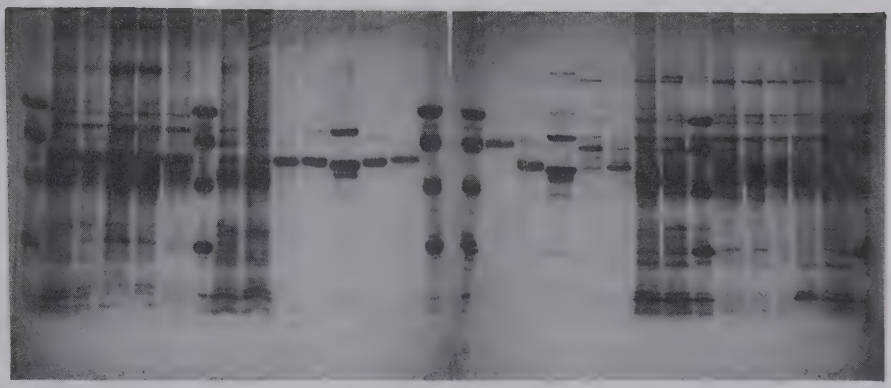


Abbildung 19: SDS-PAGE der Aufarbeitungsstufen einer Lebermikrosomenaufarbeitung.

7 - 14 % Acrylamid Gradientengele. In der Durchführung wurde nach 4.6.1 verfahren.

19 A: Proben nicht reduziert aufgetragen

19 B: Proben reduziert aufgetragen

Probe	Proteinkonzentration je Probe
1 Standard	10 µg je Protein
2 LM	100 µg
3 LM	50 µg
4 LME	100 µg
5 LME	50 µg
6 XADEÜ	100 µg
7 Standard	10 µg je Protein
8 Pellet*	100 µg
9 XADEP *	100 µg
10 Aktivität B1	30 µg
11 Aktivität B2	30 µg
12 Aktivität C	30 Ug
13 Eluat 1**	20 µg
14 Eluat 2**	5 µg
15 Standard	10 µg je Protein

Standardproteine: Phosphorylase b (P), Albumin (A), Ovalbumin (O), Chymotrypsinogen A (C)

* Die mit Pellet und XADEP bezeichneten Proben vgl. Aufarbeitungsschema in 5.2..

** Die mit Eluat 1 und 2 bezeichneten Proben werden in 5.8. behandelt.

Die Standardproteine wurden nur in reduzierter Form aufgetragen. Die Gele wurden gefärbt und getrocknet.

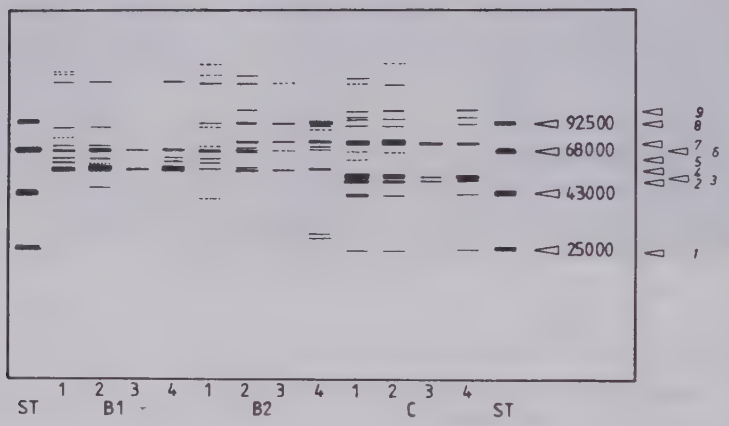


Abbildung 20: Vergleich der Proteinbandenmuster der Aktivitäten B1, B2 und C nach SDS-PAGE.

Es sind vier verschiedene Aufarbeitungen aufgeführt (1-4). Die Probenvorbereitung und Elektrophoresebedingungen entsprechen denen in Abbildung 20 B (reduziert).
St = Standardproteine entsprechend Abb. 19 .
Die stets auftretenden Hauptbanden der partiell gereinigten drei Aktivitäten B1, B2 und C nach Chromatographie an DEAE-Sephadex A50 sind mit Pfeil markiert und wurden von 1 - 9 durchnummeriert.

Im reduzierten sowie nicht reduzierten Zustand weisen die LM, LME und XADEÜ ähnliche Proteinbandenmuster auf. Die während der Aufarbeitung anfallenden Pellets (mit XADEP und Pellet bezeichnet, vgl. Aufarbeitungsschema in 5.2.) weisen ebenfalls ähnliche Bandenmuster auf, unterscheiden sich allerdings von den Bandenmustern der LM, LME und XADEÜe. Dies trifft im reduzierten sowie nicht reduzierten Zustand zu.

Abbildung 20 zeigt eine Gegenüberstellung der Proteinbanden der partiell gereinigten Aktivitäten B1, B2 und C aus verschiedenen Mikrosomenpräparationen. Es treten bei jeder Präparation für die einzelnen Aktivitäten die folgenden Hauptbanden regelmäßig auf:

Abbauaktivität	Banden (MG) 1	2	3	4	5	6	7	8	9
B1				56000	64000	68000			
B2				56000		68000	75000	91000	
C	25000	50000	53000				75000		105000

Die Molekulargewichte wurden nach Kap. 5.4. bestimmt (Abb. 21). Die Gegenüberstellung der Proteinhauptbanden der Insulinabbauaktivitäten B1, B2 und C (vgl. auch Abb. 19 und 20) zeigt, daß die bei Aktivität B1 und A auftretenden Proteinbanden auch bei Aktivität B2 erscheinen. Dies kann auf die Elutionsbedingungen der Ionenaustauschchromatographie zurückzuführen sein. Durch NaCl der Konzentration 0,18 M kann mit 0,1 M NaCl nicht vollständig eluiertes Protein, und bereits ein Teil des mit 0,3 M NaCl eluierbaren Proteins verdrängt werden (vgl. 5.2. und 5.3.2.3.). Eine weitere Erklärung ist durch das Molekulargewicht und die Isoelektrischen Punkte (IP) von Proteinen möglich, da Proteine mit gleichem Molekulargewicht aber unterschiedlichem IP mit verschiedenen NaCl-Kontentrationen vom Austauscher verdrängt werden. Demnach kann es sich bei den Proteinbanden mit MG 56000 und 68000 die bei Aktivität B1 und B2 auftreten und der Proteine mit MG 75000 die bei Aktivität B2 und C auftreten einerseits um gleiche Proteine und anderseits um unterschiedliche Proteine mit gleichem Molekulargewicht aber unterschiedlichem IP handeln. Das Zutreffen beider Bedingungen ist ebenfalls möglich.

Die Unterschiedlichkeit der Bandenmuster für die einzelnen Aktivitäten (Abb. 20) und die Intensitätsdifferenzen der Banden ist durch ungleiche Proteinkonzentrationen der aufgetragenen Proben zu erklären. Auch geringe Differenzen der Ionenstärke oder des pH-Wertes bei der Elution der Proteine während der Anionenaustauschchromatographie kann eine Verschiebung von Banden oder deren Intensitäten bewirken.

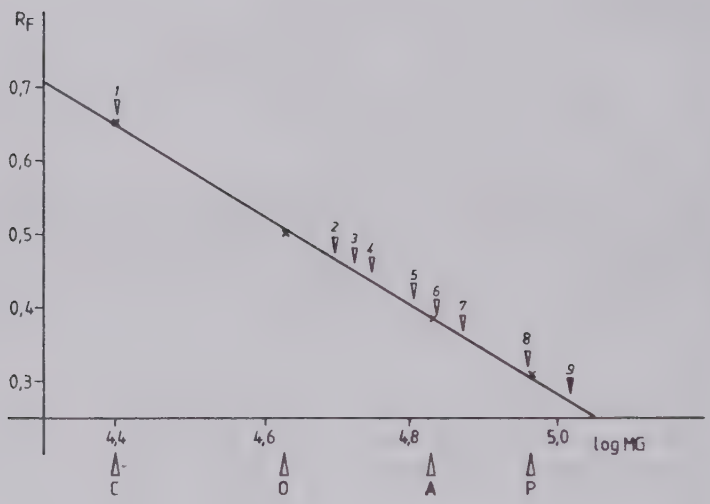


Abbildung 21: Molekulargewichtsbestimmung der in Abbildung 19 dargestellten Protein-Hauptbanden der partiell gereinigten Aktivitäten B1, B2 und C nach Laemmli. Durchführung vergleiche 4.9.2..

Als Standardproteine (mit Pfeil markiert) wurden verwendet:

Phosphorylase b (P)	92 500 MG
Albumin (A)	68 000 MG
Ovalbumin (O)	43 000 MG
Chymotrypsinogen A (C)	25 000 MG

Molekulargewichte der Banden 1 - 9:

Bande	MG	Bande	MG	Bande	MG
1	25 000	4	56 000	7	75 000
2	50 000	5	64 000	8	91 000
3	53 000	6	68 000	9	105 000

5.5. Molekulargewichtsbestimmung der Insulinabbauaktivitäten B1, B2, C und A durch Gelchromatographie an Sephacryl S300 Superfine

Zur Molekulargewichtsbestimmung und als weiterer Reinigungsschritt wurden die Insulinabbauaktivitäten A, B1, B2 und C an Sephacryl S300 Superfine chromatographiert. Wie bereits beschrieben (5.2.) wird die Insulinabbauaktivität A nicht vom Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A50 gebunden. Vor Chromatographie an Sephacryl S300 wurde für diese Aktivität daher nach Umpuffern als weiterer Reinigungsschritt eine Chromatographie an SP-Sephadex C25 mittels NaCl-Gradient in 0,1 M NaAc pH 4,2 vorgenommen (nicht gezeigt). Die Aktivität A eluiert hier bei 0,18 M NaCl in Elutionspuffer. Die Spitzenfraktionen mit Abbauaktivität wurden vereinigt und wie die der Aktivitäten B1, B2 und C, in Methode 4.9.1. beschrieben aufgearbeitet.

Die Fraktionen der S300-Säulenläufe wurden mittels TCA-Fällung und RIA (entsprechend der Ionenaustauschchromatographie, 5.2.) auf Abbauaktivität getestet. Proben der Spitzenfraktionen mit Insulinabbauaktivität wurden einer SDS-PAGE unterzogen. Nach Austesten der Abbauaktivitäten B1, B2 und C erhält man Insulinabbaupeaks im gleichen Elutionsbereich über 6 - 9 Fraktionen verteilt. In Abbildung 22 ist der Elutionsbereich mit Pfeil 2 und 3 markiert, was einem Molekulargewicht von 58 000 - 78 000 entspricht. Für Aktivität A ist die Spitzenfraktion des Insulinabbaupeaks mit Pfeil 1 markiert, der einem Molekulargewicht von 37 000 entspricht. Die SDS-PAGE ergibt für die Abbauaktivität A keine anfärbbare Proteinbande. Für die Aktivitäten B1, B2 und C sind die Proteinbandenmuster in Abbildung 23 dargestellt. Zum besseren Vergleich der Proteinbandenmuster wurden Proben von Spitzenfraktionen der Abbauaktivitäten vor und nach Gelchromatographie gegenübergestellt.

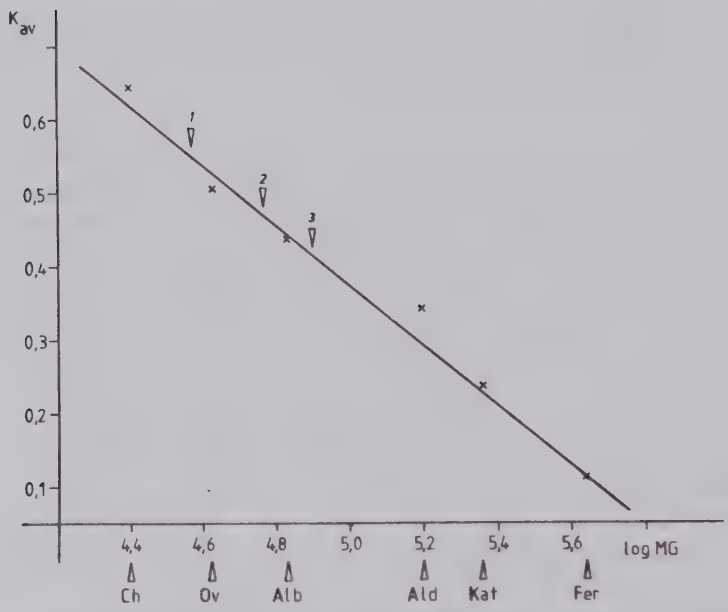


Abbildung 22: Molekulargewichtsbestimmung der Insulinabbauaktivitäten A, B1, B2 und C an Sephacryl S300 Superfine.

Die Durchführung der Säulenläufe und die Aufstellung der Eichkurve ist unter 4.9.1. beschrieben.

Als Standardproteine (mit Pfeil markiert) wurden verwendet:

		MG
Chymotrypsinogen A	Ch	25 000
Ovalbumin	Ov	43 000
Albumin	Alb	68 000
Aldolase	Ald	158 000
Katalase	Kat	232 000
Ferritin	Fer	440 000

Pfeil 1: MG Aktivität A, 37 000
Pfeil 2,3: MG-Bereich der Abbauaktivitäten B1, B2 und C, 59 000 - 78 000

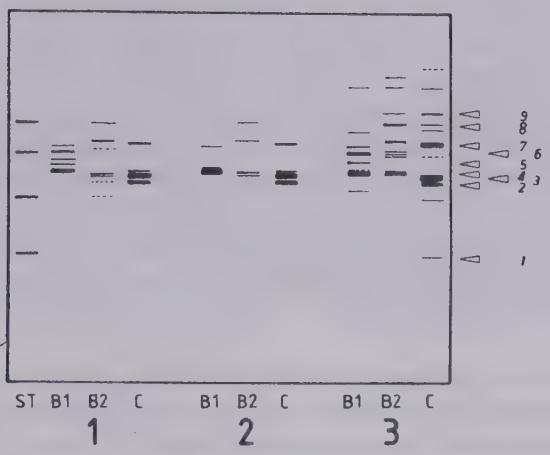


Abbildung 23: SDS-PAGE von Spitzenfraktionen der Insulinabbauaktivitäten nach Chromatographie an Sephacryl S300 Superfine.

Die Probenvorbereitungen und Elektrophoresebedingungen entsprechen denen in Abbildung 19 A/B.

ST = Standardproteine entsprechend Abb. 19
1 = Proben reduziert nach Gelfiltration
2 = Proben nicht reduziert nach Gelfiltration
3 = Proben reduziert vor Gelfiltration

Die mit Pfeil markierten Banden 1 - 9 entsprechen denen aus Abbildung 20.

Proteine, die im nativen Zustand aus mindestens zwei dissoziierbaren Untereinheiten (MG ca. 50 000 - 70 000 pro Untereinheit) bestehen, werden durch die Gelchromatographie abgetrennt. Diese Proteine sind nach Gelfiltration nicht mehr nachweisbar. Aus Abbildung 23 ist zu ersehen, daß nach Gelfiltration die Aktivitäten B1 und C im MG-Bereich 50 000 - 80 000 keine Veränderungen im Proteinhauptbandenmuster aufweisen. Das Verschwinden von Proteinbanden in diesem MG-Bereich weist auf die Abtrennung der oben beschriebenen Proteine hin. Der Vergleich der reduzierten und nichtredu-

zierten Proben nach Gelchromatographie zeigt, daß keine zusätzlichen Proteinbanden im niedermolekularen Bereich (kleiner MG 40 000) auftreten. Dies ist ein Hinweis dafür, daß es sich hier um Proteine mit nur einer Proteinkette handeln muß (vgl. auch Abb. 24). Das Auftreten von zusätzlichen Proteinbanden im MG-Bereich von 50 000 - 70 000 (Abb. 23, Aktivität B1 und B2) weist auf Proteine mit Disulfidbrücken hin, die im reduzierten Zustand eine andere Konformation annehmen (Random-coile-Struktur). Demnach besitzen die Abbauaktivitäten B1, B2 und C ein Molekulargewicht zwischen 50 000 und 80 000 und bestehen aus nur einer Proteinkette.

Von der Insulinabbauaktivität C zeigt die Abbildung 24 die Elektophorese von Proben der Spitzenfraktionen aus der Ionenaustauschchromatographie (Abb. 24 A) mit anschließender Gelfiltration (Abb. 24 B) über einen breiten Fraktionsbereich. In Abbildung 24 A sind mit Pfeil die vereinigten Fraktionen für die Gelchromatographie markiert. In Abbildung 24 B ist der Reinigungseffekt einer Gelfiltation gezeigt. Mit dem Pfeil ist die Fraktion mit höchster Abbauaktivität markiert. Die Lage der Intensitätsmaxima der höher- und niedermolekularen Hauptbanden läßt den Schluß zu, daß eine der Banden im MG-Bereich 50 000 bis 55 000 (zwischen Albumin und Ovalbumin) der Abbauaktivität C zuzuordnen ist. Eine ähnliche Aussage für Aktivität B1 und B2 ist nicht möglich. Wie in Abbildung 23 gezeigt, entstehen für Aktivität B1 erst nach Reduktion der Proteine zusätzliche Proteinbanden. Eine Aussage darüber, ob die Aktivität einer der in reduziertem Zustand auftretenden Bande entspricht ist nicht möglich. Der nach Gelfiltration erhaltene Abbauaktivitätspeak für Aktivität B2 ist sehr flach und erstreckt sich über eine größere Anzahl von Fraktionen. Außerdem treten auch hier nach Reduktion der Proteine zusätzliche Proteinbanden auf. Eine genaue Zuordnung einer Proteinbande zur Abbauaktivität ist deshalb nicht möglich.

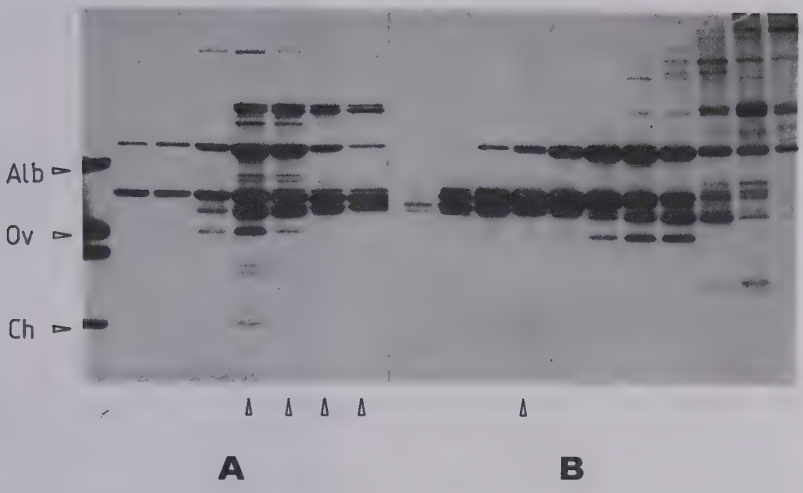


Abbildung 24: SDS-PAGE von Fraktionen des DEAE-Sephadex A50- und Sephacryl S300-Säulenlaufes der Insulinabbauaktivität C.

7 - 14 % Acrylamid Gradientengele

A: Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephadex A50
B: Gelchromatographie an Sephacryl S300

Es wurden nur reduzierte Proben aufgetragen. Die Probenkonzentrationen in den Spitzenfraktionen entsprechen denen aus Abbildung 19, Probe 12.
Von links nach rechts sind in Abb. A die Fraktionen mit steigender Fraktionszahl, in Abb. B mit fallender Fraktionszahl aufgetragen. Die in Abb. A mit Pfeil markierten Fraktionen wurden vereinigt und zur Gelchromatographie eingesetzt (vgl. 4.9.1.). Die in Abb. B mit Pfeil markierte Fraktion stellt die Spitzenfraktion mit Insulinabbauaktivität dar.

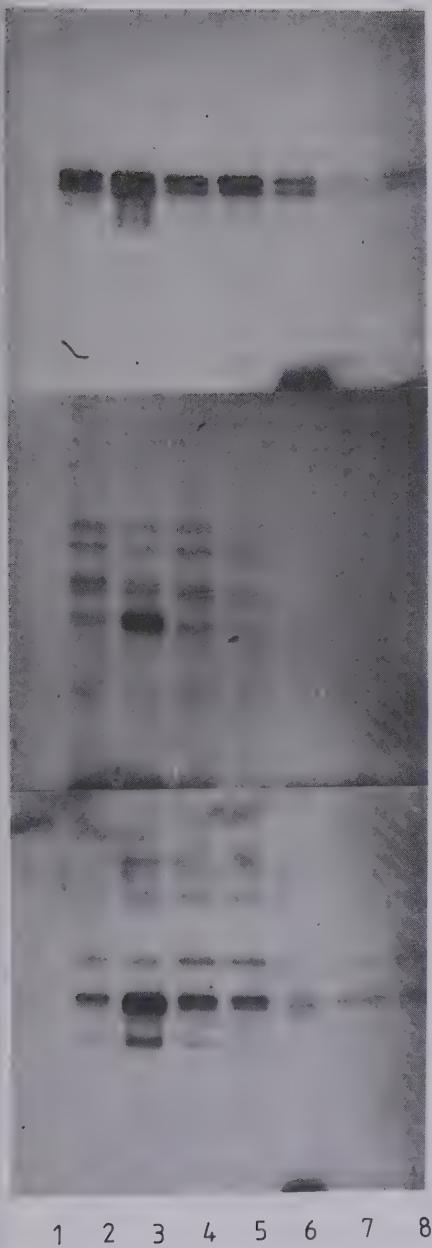
Alb = Albumin
Ov = Ovalbumin
Ch = Chymotrypsinogen A

5.6. Photoaffinitätsmarkierung der Insulinabbauaktivität B1, B2 und C

Da bisher keine eindeutige Zuordnung von Insulinabbauaktivität zu den mittels Elektrophorese auftretenden Proteinbanden möglich war, wurde versucht, die Abbauaktivität durch Photoaffinitätsmarkierung mittels 125J-MABI zu identifizieren. Andererseits wäre durch die Markierung der Abbauaktivität eine weitere Reinigung der Abbauaktivität erleichtert, da durch Bestimmung der Radioaktivität das Austesten durch TCA-Fällung und RIA auf ein Minimum eingeschränkt werden könnte.

Vorversuche zu den besten Photolysebedingungen zeigten, daß Eiskühlung und eine Filterung des hochenergetischen UV-Anteils (unterhalb 300 nm) der Lichtquelle notwendig sind, da sonst die Proteine während der Photolyse zerstört werden. Die Eiskühlung wurde auch unter dem Gesichtspunkt der Erniedrigung der Abbaugeschwindigkeit gewählt.

Abbildung 25 zeigt die Autoradiogramme der Photoaffinitätsmarkierten Abbauaktivitäten B1, B2 und C. Für die Elektrophoresen wurden nichtreduzierte Proben verwendet. Nach Reduktion der markierten Proben und anschließender Elektrophorese sind nur noch sehr schwache Banden zu sehen. Die radioaktive Gruppe von 125J-MABI sitzt zu mindestens 70 % in der A-Kette, während die photoreaktive Gruppe in der B-Kette sitzt. Durch Reduktion der Probe bleibt die B-Kette am Protein gebunden, und die A-Kette mit der Hauptradioaktivität geht verloren. Die Markierungen wurden mit Kombinationen von GSH, NEM und nat. Insulin durchgeführt. Abbildung 25 zeigt, daß mit GSH im Ansatz die höchste Markierungsrate erreicht wurde. Abbauaktivität $\pm$ NEM ergeben gleiche Markierungsraten. Mit nat. Insulin im Ansatz sind noch schwache Markierungen möglich. Bei allen Markierungen treten mehrere Radioaktivitätsbanden pro Abbauaktivität auf.



Autoradiographie der photoaffinitätsmarkierten Abbauaktivitäten B1, B2 und C.

Inkubationsansatz:

50 µg Aktivität B1, C oder
10 µg Aktivität B2
+/- 10 µl GSH, 10 mM
+/- 10 µl NEM, 10 mM oder 100 mM
+/- 20 µl nat. Insulin, 1 mg/ml
\+ mit 0,1 M KNaPP, pH 7,4/ 0,08 % Triton ad 200 µl

Nach Vorinkubation Zugabe von 10 µl 125J-MABI (50 000 cpm) im Dunkeln. Weitere Versuchsdurchführung wie unter 4.10..
Von Aktivität B1 und C wurden 10 µg, von Aktivität B2 2 µg Protein pro Tasche aufgetragen.

a = Aktivität B1
b = Aktivität B2
c = Aktivität C

Probenauftragung:

1 = 2 ohne Belichtung
2 = AA + 125J-MABI
3 = AA + 125J-MABI + GSH, 0,5 mM
4 = AA + 125J-MABI + NEM, 5,0 mM
5 = AA + 125J-MABI + NEM, 0,5 mM
6 = 2 + nat. Insulin, 17 µM
7 = 3 + nat. Insulin, 17 µM
8 = 4 + nat. Insulin, 17 µM

Die Probenauftragung ist in Abbildung a, b und c gleich. Die Gele wurden gefärbt, getrocknet und autoradiographiert.

Mit Pfeil ist die Laufstrecke von Albumin markiert.

AA = Abbauaktivität

Abbildung 25:

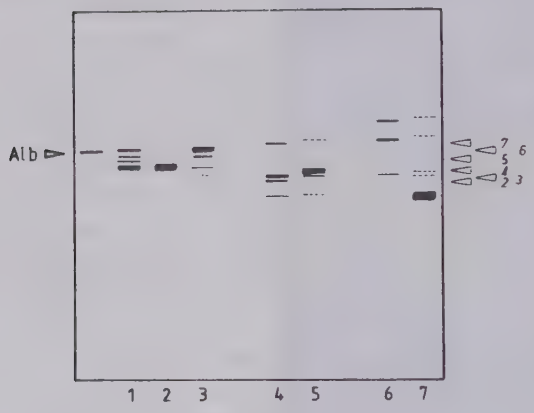


Abbildung 26: Vergleich der Proteinbanden und der photoaffinitätsmarkierten Banden von Aktivität B1, B2 und C. Die Inkubationsansätze und Behandlungen der Gele entsprechen denen in Abbildung 25.

Alb = Albuminbande reduziert

Mit Pfeil sind die Proteinbanden 2 - 7 entsprechend der Abbildung 20 markiert.

1 = Proteinbanden der Aktivität B1, reduzierte Probe
2 = Proteinbande der Aktivität B1, nicht reduzierte Probe
3 = Photoaffinitätsbanden aus Abb. 25 a/3
4 = Proteinbanden der Aktivität C, nicht reduzierte Probe
5 = Photoaffinitätsbanden aus Abb. 25 b/3
6 = Proteinbanden der Aktivität B2, nicht reduzierte Probe
7 = Photoaffinitätsbanden aus Abb. 25 c/3

Die Proteinbanden wurden den Gelen aus Abbildung 25 nach Anfärbung und Trocknung und die Radioaktivitätsbanden nach dessen Autoradiographie entnommen.

Als Vergleich wurden Proben ohne Belichtung aufgetragen (Probe 1 Abb. 25) die keine Markierungen ergaben.

In Abbildung 26 sind zum Vergleich die Proteinbanden der gefärbten Gele deren Autoradiogrammen gegenüber gestellt. Außer, daß nicht nur eine Radioaktivitätsbande pro Abbau-

aktivität auftritt, sind die Proteinbanden nicht mit den radioaktiven Banden deckungsgleich. Es sind verschiedene Erklärungen hierfür möglich. Eine Markierung mit 125J-MABI erhöht das Molekulargewicht der Abbauaktivität um das Molekulargewicht des Insulins (6000). Andererseits ist es möglich, daß das Substrat eine Konformationsänderung der Abbauaktivität bedingt. Mit Pfeil 2 - 7 sind die aus Abbildung 20 dargestellten Proteinhauptbanden markiert, die folgendes Molekulargewicht besitzen:

Bande	MG	Bande	MG	Bande	MG
2	50 000	4	56 000	6	68 000
3	53 000	5	64 000	7	75 000

Ausgehend von den im gleichen MG-Bereich auftretenden Protein- und Radioaktivitätsbanden ergeben sich für Aktivität B1 (Bande 4) und Aktivität C (Bande 3) jeweils eine deckungsgleiche Radioaktivitätsbande. Weiterhin treten für Aktivität B1 Molekulargewichtsdifferenzen von 6000 und 12000 zwischen der nichtreduzierten Proteinbande und den Radioaktivitätsbanden auf. Für Aktivität C für Bande 2 und 3 eine Differenz von 3000 und 6000 und bei Aktivität B2 für die einzelnen Proteinbanden jeweils eine Differenz zur Radioaktivitätsbande von 3000. Da bei allen drei Aktivitäten mehr als eine markierte Bande auftritt, ist die Frage der Spezifität und der Bandenzuordnung nicht klärbar.

Mit GSH im Ansatz tritt bei Aktivität B2 und C im MG-Bereich von 40 000 eine Bande auf, die besonders stark bei Aktivität B2 vorhanden ist (Abb. 25 b/c). In diesem MG-Bereich ist für Aktivität B2 keine Proteinbande sichtbar. Nach Chromatographie an Sephacryl S300 konnte in diesem MG-Bereich keine Abbauaktivität nachgewiesen werden. Bei Strukturuntersuchungen am Insulinrezeptor wird das Auftreten von Banden in diesem MG-Bereich beschrieben (107). Es soll sich hier um ein Insulin-Rezeptor-Bruchstück handeln, welches durch proteolytische Spaltung am Insulinrezeptor während der Aufarbeitung entsteht. Deren GSH-Aktivierbarkeit ist allerdings nicht erklärbar. Ebenfalls ist das Auftreten einer proteolytisch

veränderten Abbauaktivität denkbar, welche Bindungsaffinität allerdings keine Abbauaktivität mehr besitzt.

5.7. PAGE zur Untersuchung von Insulin und Insulinbruchstücken nach Insulinabbau

Die bisher angewandten Methoden zur Untersuchung des Insulinabbaus lassen keine eindeutigen Aussagen zur Unterscheidung der Insulinabbauaktivitäten zu. Auch die Gelfiltration der Insulinabbauprodukte läßt diese Frage offen. Als weitere Methode zur Trennung der Insulinabbauprodukte nach Molekülgröße scheidet die SDS-PAGE aus, da im niedermolekularen Bereich (kleiner MG 5000) keine Trennungen möglich waren. Aus diesem Grund wurde die PAGE nach Davis angewandt. Diese Methode trennt Moleküle nach ihrer Ladung und Größe.

5.7.1. Elektrophoretische Trennung verschiedener Insuline

Ein wesentliches Erfordernis für Untersuchungen bei denen Insulin oder Insulinderivate eingesetzt werden, stellt ihre Reinheit dar. So kann ein unsauberes Ausgangsprodukt bei bestimmten Untersuchungsmethoden zu komplexen und unüberschaubaren Ergebnissen führen. Abbildung 27 zeigt verschiedene Insuline nach PAGE. Es sind Rinderinsulin, Monokomponentes (mc) Rinderinsulin, mc Schweineinsulin, CT-125J-Insulin (Rind), mc Mono-^{125}J-(Tyr^{A14})Insulin vom Schwein, Rind und Mensch, sowie dansyliertes Rinderinsulin dargestellt. Die Insuline der unterschiedlichen Spezies Schwein, Rind und Mensch, die sich durch ihre AS-Sequenz in der Position 8 und 10 in der A-Kette und 30 in der B-Kette unterscheiden, zeigen gleiches Laufverhalten auf der Elektrophorese, da die Differenzen in der AS-Sequenz weder einen Ladungsunterschied noch eine wesentliche Molekulargewichtsdifferenz mit sich bringt.

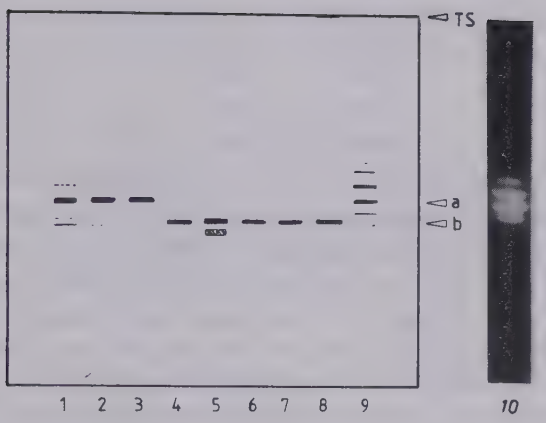


Abbildung 27: PAGE nach Davis von verschiedenen Insulinen. Versuchsdurchführung vergleiche 4.6.1..

16 % Acrylamid Gel

TS = Trenngel-Start
a = Proteinhauptbanden der nativen Insuline
b = Radioaktivitätshauptbande der 125J-Insuline

Probenauftragung:

	Protein pro Tasche (µg)	Radioaktivität pro Tasche (cpm)
1 = Rinderinsulin	20	
2 = mc Rinderinsulin	20	
3 = mc Schweineinsulin	20	
4 = mc Mono-125J-(Tyr-A14)Insulin Schwein (nach 4.2.2.)*		1500
5 = CT-125J-Insulin Rind (nach 4.2.1.)		800
6 = mc Mono-125J-(Tyr-A14)Insulin Rind (nach 4.2.2.)		800
7 = mc Mono-125J-(Tyr-A14)Insulin Schwein (nach 4.2.2.)*		800
8 = mc Mono-125J-(Tyr-A14)Insulin Mensch (von Fa. Eli Lilly, Bad Homburg)		800
9 = dansyliertes Insulin Rind (nach 4.4.)	5	

10 = Photographie der fluoreszierenden Banden von Dansylinsulin entsprechend 9

Die Proteinbanden wurden durch Anfärbung, die Radioaktivitätsbanden durch Autoradiographie und die Fluoreszenzbanden mittels UV-Licht (280 o. 305 nM) des selben Gels dargestellt.

* 125J-Insuline verschiedener Präparationen

Aminosäuresequenz-Differenzen:

Position A/B-Kette	Mensch	Schwein	Rind
A 8	Thr	Thr	Ala
A 10	Ile	Ile	Val
B 30	Thr	Ala	Ala

Im Gegensatz dazu laufen die entsprechenden jodierten A14-Insuline eine beträchtliche Strecke weiter. Dies ist durch die pK-Wert-Verschiebung der phenolischen OH-Gruppe durch Jod zu erklären (88, 112). Weiterhin zeigt das Rinderinsulin drei zusätzliche Banden, was einerseits auf Desamidoinsuline und zum anderen auf mögliche Verunreinigung durch Proinsulin oder andere Proteine zurückzuführen sein kann. Auch das Dansylinsulin, welches nach Gelchromatographie nur einen Insulinpeak aufweist zeigt bei entsprechend hohen Konzentrationen auf der Elektrophorese bis zu 6 unterschiedliche Banden. Die endständigen Aminofunktionen von Gly A1, Phe B1 und Lys B29 erlauben bereits sieben unterschiedliche Dansylierungsprodukte.

5.7.2. Reaktion von Insulin mit Reduktionsmitteln und Insulinabbauinhibitoren

Für TCA-Fällungen und Radioimmunoassays zur quantitativen Bestimmung von Insulinabbau spielt die Reinheit der verwendeten Insuline nur eine untergeordnete Rolle. Für die Gelchromatographie oder Elektrophorese von Insulinabbauprodukten sind weitaus größere Anforderungen an die Ausgangssubstanzen zu stellen. Je mehr unbekannte Faktoren bei der Behandlung der Problematik des Insulinabbaus vorhanden sind, wozu auch die Anzahl der beteiligten unterschiedlichen Insulinabbauaktivitäten zählt, desto schwieriger werden eindeutige Aussagen über die Entstehung der Insulinfragmente sowie die Klärung der Frage nach der Anzahl der beteiligten unterschiedlichen Insulinabbauaktivitäten. Durch die Verwendung von monokomponentem Mono-^{125}J-(Tyr^{A14})Insulin

(125J-A14-Insulin) wurde die Frage der möglichen entstehenden Insulinfragmente auf die des beteiligten ^{125}J-Tyr in der Position 14 der A-Kette beschränkt.

Zum Nachweis von ^{125}J-(Tyr^{14})A-Kette wurden Reduktionen von 125J-A14-Insulin mittels Glutathion (GSH) und Dithioerythrit (DTE) durchgeführt. Die reduzierten Proben wurden hierbei zum Teil mit N-Ethylmaleimid (NEM) gestoppt. Bei dieser Untersuchung zeigte sich, daß 125J-A14-Insulin durch NEM strukturell verändert wurde.

5.7.2.1. Reaktion von Insulin mit N-Ethylmaleimid und Glutathion

Zur Klärung der Reaktivität von NEM gegenüber Insulin wurde CT-125J-Insulin und 125J-A14-Insulin mit NEM und GSH in Kombination mit nativem Insulin zeit- und temperaturabhängig untersucht. Um nach PAGE auch weniger starke Radioaktivitätsbanden zu identifizieren, wurden zur Elektrophorese hohe Aktivitäten pro Tasche (2500 cpm) aufgetragen und verschiedene Belichtungszeiten für die Autoradiographie gewählt.

Die Abbildung 28 zeigt Autoradiogramme mit unterschiedlicher Inkubationszeit von 125J-Insulinen mit NEM nach einem Tag Belichtung. In Abbildung 29 sind alle Banden der Autoradiographien nach langer Belichtungszeit (3 Tage) dargestellt. Die Hauptbanden des CT-125J-Insulins und deren Reaktionsprodukte sind mit Buchstaben, die des 125J-A14-Insulins mit Zahlen markiert. Bei langer Belichtungszeit sind die Hauptbanden überbelichtet und verschmelzen teilweise ineinander. Bei kurzer Belichtungszeit sind die schwachen Banden nicht zu sehen. Die Banden, die nach drei Tagen Belichtungszeit zusätzlich zu denen in Abbildung 28 gezeigten auftreten sind in der folgenden Zusammenstellung mit Stern markiert.

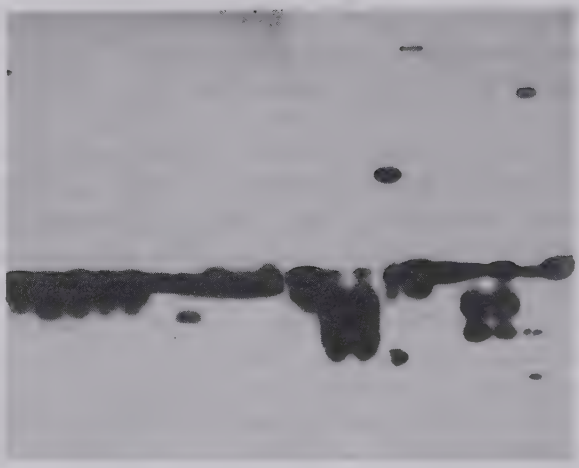


Abbildung 28: Autoradiogramm der PAGE von 125J-Insulinen nach Behandlung mit NEM und GSH. Versuchsdurchführung vgl. 4.6.1..

16 % Acrylamid Gele

Inkubation:

200 000 cpm CT-Insulin oder 125J-A14-Insulin in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton (Tris/HCl)
+/- 40 µl NEM 100 mM
+/- 40 µl GSH 10 mM
+/- 40 µl nat. Insulin 1 mg/ml
+ Tris/HCl ad 1000 µl

Pro Tasche wurden 2500 cpm aufgetragen. Die Gele wurden nach Elektrophorese getrocknet und 1 Tag bei - 80° C autoradiographiert.

A: Inkubation 1 h bei + 30° C
B: Inkubation 2 Tage bei 4° C

Probenauftragung:

1 = CT-125J-Insulin
2 = CT-125J-Insulin + NEM 4 mM
3 = CT-125J-Insulin + NEM + nat. Insulin 4 mM/7 µM
4 = CT-125J-Insulin + GSH 0,4 mM
5 = CT-125J-Insulin + GSH + nat. Insulin 0,4 mM/7 µM
6 - 10 entspricht 1 - 5 mit 125J-A14-Insulin im Ansatz

TS = Trenngel-Start

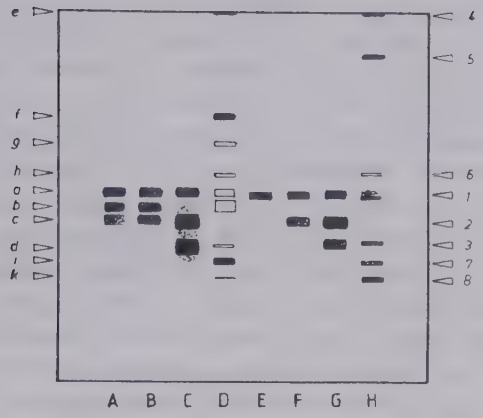


Abbildung 29: Autoradiogramm der PAGE von 125J-Insulinen nach Behandlung mit NEM und GSH. Der Inkubationsansatz und die Elektrophoresebedingungen entsprechen denen aus Abbildung 28. Die Belichtungszeit beträgt dagegen 3 Tage bei - 80° C.

A = CT-125J-Insulin
B = CT-125J-Insulin + NEM (4mM), 1 h Inkubation bei +30° C
C = CT-125J-Insulin + NEM (4mM), 2 Tage Inkubation bei +4° C
D = CT-125J-Insulin + GSH (0,4mM), 2 Tage Inkubation bei +4° C
E - H entspricht A - D mit 125J-A14-Insulin im Ansatz.

Die mit Pfeil markierten Banden sind für CT-125J-Insulin mit kleinen Buchstaben, für 125J-A14-Insulin mit Zahlen beschriftet.
Die Höhe der Bande e und 4 entspricht dem Trenngel-Start.

Bande	CT-125J-Insulin				Bande	125J-A14-Insulin			
	A	B	C	D		E	F	G	H
e				o*	4				o
f				o	5				o
g				o*	6				o*
h				o*	1	o	o	o	o
a	o	o	o	o	2		o	o	
b	o	o		o	3			o	o
c	o*	o	o		7				o*
d			o	o*	8				o
i				o					
k				o*					

Die Großbuchstaben entsprechen den Bezeichnungen in Abb. 29.

Die Ergebnisse zeigen, daß auch bei sehr großen Mengen an Radioaktivität 125J-A14-Insulin nur eine Radioaktivitätsbande aufweist, während CT-125J-Insulin drei Banden aufweist. Mit NEM und 125J-A14-Insulin im Ansatz tritt schon nach 1 h Inkubation bei + 30° C eine zusätzliche Bande (2) auf, während bei CT-125J-Insulin die Bande c verstärkt ist. Nach zwei Tagen Inkubation bei + 4° C ist ca. 80 % von beiden 125J-Insulinen umgesetzt und die Banden d und 3 treten zusätzlich auf. Mit nativem Insulin im Ansatz entstehen die gleichen Bandenmuster. Nach 1 h Inkubation sind die Banden jedoch wesentlich schwächer im Vergleich zum Ansatz ohne natives Insulin. Dies ist möglicherweise auf die Dimerisierung von Insulin, die bei hohen Konzentrationen (10^{-5} M) auftritt, zurückzuführen. Die Umsetzung von 125J-Insulin mit NEM ist auch bei - 30° C nicht zu verhindern. Nach Inkubation bei - 30° C treten nach 4 Tagen die gleichen Veränderungen im gleichen Ausmaß wie nach 2 Tagen bei + 4° C auf. Dies gilt ebenfalls für Reaktionen mit GSH im Ansatz (nicht gezeigt).

Mit GSH im Ansatz ist nach 1 h Reaktionszeit bei + 30° C ± nat. Insulin noch keine zusätzliche Bande zu erkennen. Nach 3 h treten hier die ersten Banden auf. Dies bestätigt die in 5.3.1. und 5.3.2.3. dargestellten Ergebnisse bezüglich des GSH-Abbaus von Insulin (Leerwerte), d. h. GSH hat bei diesen Inkubationsbedingungen keinen Einfluß auf den Insulinabbau.

Trotz eines 10^6-fachen Überschußes an GSH gegenüber Insulin im Ansatz treten mehrere verschiedene Reaktionsprodukte für beide 125J-Insuline auf. Dies ist einerseits durch Disulfidaustausch von Insulin mit A- und B-Kette zu erklären (158), da auch Banden mit kleineren R_F-Werten (4, 5 und 6 125J-A14-Insulin) auftreten. Die Bande 5 liegt genau in derselben Höhe wie die Albuminbande in gefärbten Gelen. Sie tritt nicht bei CT-125J-Insulin auf. 125J-A14-Insulin-Stammlösung enthält im Gegensatz zu CT-125J-Insulin-Stamm-

lösung Albumin, da die Elution des 125J-A14-Insulins mit Albumin im Elutionspuffer durchgeführt wird. Frühere Untersuchungen (127) haben gezeigt, daß nach Insulinabbau und Gelfiltration der Abbauprodukte an Sephadex G50 fine sehr hohe Mengen an Radioaktivität im Ausschlußvolumen eluiert werden, wenn Albumin im Inkubationsansatz vorhanden ist. Albumin selbst besitzt 1 freie SH-Funktion und mehrere Disulfidbrücken. Demnach kann auch mit Albumin ein Disulfidaustausch vor sich gehen, wenn GSH im Inkubationsansatz anwesend ist. Andererseits sind die unterschiedlichen Banden mit hohem R_F-Wert (3, 7 und 8, 125J-A14-Insulin) durch verschieden häufige GSH-Substitution der A-Kette zu erklären. A-Kette enthält 4 Cysteine, die jeweils mit einem GSH belegt sein können. Der große Überschuß an GSH spricht allerdings gegen diese Darstellung. Die Oxidation von SH-Funktionen durch Luftsauerstoff ist eine weitere mögliche Erklärung des Auftretens der verschiedenen Banden. Es können hierbei alle freien SH-Funktionen beteiligt sein und demnach hochmolekulare und niedermolekulare Reaktionsprodukte auftreten. Die Reproduzierbarkeit der Bandenmuster und die Bandenschärfe spricht gegen eine Aufoxidation während der Elektrophorese, was im späteren Ergebnisteil belegt wird.

Die A-Kette selbst besitzt auf Grund ihrer Größe und ihres IPs einen größeren R_F-Wert als Insulin, während die B-Kette aus diesen Gründen einen kleineren R_F-Wert als A-Kette besitzt und in Höhe von Insulin läuft. Das CT-125J-Insulin enthält auch B-Ketten-jodierte Tyrosine, worauf der Unterschied des Bandenmusters von 125J-A14-Insulin und CT-125J-Insulin zurückzuführen ist.

Die strukturelle Veränderung von Insulin durch NEM warf neue Fragen bezüglich des RIAs und der Gelchromatographie an Sephadex G50 fine auf, da bei beiden Methoden NEM zum Stoppen der Reaktionsansätze verwendet wurde. Die Verfälschung von Ergebnissen konnte deshalb nicht ausgeschlossen

werden. Die Klärung der Probleme wurde durch folgende Untersuchungen erbracht:

1. Prüfung der Frage, welche reaktiven Gruppen von Insulin mit NEM reagieren.
2. Überprüfung des Bindungsverhaltens des mit NEM umgesetzten Insulins gegenüber Insulinantikörper.
3. Inkubation von Insulin mit NEM unter sauren Bedingungen.

5.7.2.1.1. Reaktivität von NEM mit Aminofunktionen

NEM reagiert mit Thiol-Gruppen. Durch nucleophile Addition entsteht ein Cystein-Addukt,welches sich im basischen zum Thiazan-Derivat umlagern kann. Eine weitere mögliche Reaktion stellt die N-Acylierung von α- und ε-NH_2-Gruppen dar. Diese Reaktion sollte allerdings nur im alkalischen vor sich gehen (13, 145, 146). Die Reaktivität von Aminosäuren gegenüber NEM wurde daraufhin in Tris/HCl-Puffer geprüft. Abbildung 30 zeigt ein Dünnschicht-Chromatogramm der Aminosäuren Glycin, Histidin, Arginin, Lysin und Phenylalanin sowie von Glutathion reduziert (GSH) und Glutathion oxidiert (GSSG) mit und ohne NEM. Falls NEM mit Aminofunktionen reagiert, sollte bei Aminosäuren mit zwei Aminofunktionen ein zusätzliches ninhydrinfärbbares acyliertes Produkt entstehen, ebenfalls bei dem Tripeptid GSH und dessen oxidierter Form.

Dem Chromatogramm entsprechend (Abb. 30) reagieren Aminofunktionen mit NEM. Die Aminosäure Lysin und GSSG zeigen nach Inkubation mit NEM einen zusätzlichen anfärbbaren Fleck. GSH zeigt ein völlig anderes Laufverhalten gegenüber nicht umgesetztem GSH, da hier die SH-Funktion vollständig umgesetzt wurde, außerdem tritt durch die Reaktion der Aminogruppe ebenfalls ein zusätzlicher Fleck auf. Die Intensitätsänderungen der restlichen Aminosäuren ist auf der Photographie nicht sehr gut zu sehen, man kann aller-

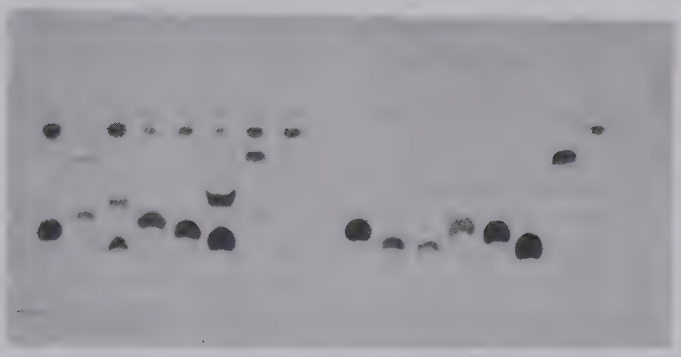


Abbildung 30: Dünnschicht-Chromatographie von Aminosäuren mit und ohne NEM-Behandlung

Inkubationsansatz:

500 µl Aminosäure (10 mM), in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4
+/- 500 µl NEM 100 mM
\+ 0,1 M Tris/HCl 0,1 M, pH 7,4 ad 5 ml

Die Lösungen wurden bis zu drei Tage bei Raumtemperatur inkubiert. Die Abbildung zeigt die Aminosäuren nach 16 h Inkubation. 10 µl je Aminosäure wurden auf das Chromatogramm aufgetragen.

1 = Glycin
2 = GSH
3 = GSSG
4 = Histidin
5 = Arginin
6 = Lysin
7 = Phenylalanin
8 = NEM

A: Ansatz mit NEM
B: Ansatz ohne NEM

Es wurden Kieselgel DC-Platten verwendet und Butanol/Eisessig/H_2O/Pyridin 30/6/24/20 als Laufmittel eingesetzt.

dings erkennen, daß die Aminosäuren ohne NEM im Ansatz etwas größere Flecken aufweisen als die Aminosäuren mit NEM im Ansatz. Die Reaktionsgeschwindigkeit von NEM gegenüber SH-Funktionen ist sehr hoch. Bereits nach 5 min. sind alle SH-Funktionen umgesetzt. Aminofunktionen reagieren wesentlich langsamer, da erst nach ca. 6 h die ersten zusätzlichen ninhydrinfärbbaren Produkte entstehen.

5.7.2.1.2. Beeinflussung der Immunreaktivität des Insulins durch NEM und GSH

Zum RIA wurden Proben eingesetzt, die 5 min. mit NEM zum Stoppen der Insulinabbaureaktion inkubiert wurden. Danach werden Antikörper zugegeben und bei + 4° C 24 h zu Einstellung des Bindungsgleichgewichtes inkubiert. Hier ergibt sich die Frage der Beeinflussung der Immunreaktivität durch NEM. Frühere Untersuchungen (127) mit Abbauinhibitoren in Bezug auf die Beeinflussung der Immunreaktivität von Insulin zeigten keine Abhängigkeiten. Zur Inhibierung des Insulinabbaus bei Radiorezeptortests wurde NEM ebenfalls eingesetzt. Eine Beeinflussung der Insulinbindung durch NEM schein gegeben zu sein (106, 107).

Zur Klärung der Problematik wurde 125J-Insulin mit NEM oder GSH vorbehandelt und anschließend die Immunreaktivität gegenüber den in Abbildung 29 dargestellten Banden 2 und 3 (Probe G) durch NEM erzeugt, und den Banden 3 - 8 (Probe H) durch GSH gebildet, getestet. Außerdem wurde untersucht, ob beim RIA während der Einstellung des Bindungsgleichgewichtes NEM ebenfalls mit Insulin reagiert.

In Tabelle 3 ist die Immunreaktivität von 125J-Insulin mit und ohne Vorbehandlung durch NEM oder GSH gegenübergestellt. Hieraus ist zu ersehen, daß die Immunreaktivität durch NEM während der Einstellung des Bindungsgleichgewichtes nicht verändert wird. Die Werte mit und ohne NEM (Probe 1 und 2) liegen gleich hoch. Nach zweitägiger Vorinkubation von 125J-Insulin mit NEM bei + 4° C und anschließendem Austesten der RIA-Fällbarkeit ist die Bindung von beiden 125J-Insulinen um 10 % heruntergesetzt. Im Vergleich hierzu ist unter gleichen Bedingungen, mit GSH-Vorinkubation, nur noch 15 - 20 % 125J-Insulin fällbar. Die Immunpräzipitate dieser Proben wurden in Probenpuffer (Methode 4.6.1.) mit nativem Insulin 30 min. dissoziiert und mittels PAGE auf Ihr Bandenmuster

Probe	% RIA-Fällbarkeit CT-125J-Insulin	125J-A14-Insulin
1	54,4	60,3
2	53,0	61,2
3	45,8	50,2
4	22.2	15,5

Tabelle 3: Immunreaktivität von CT-125J-Insulin und 125J-A14-Insulin mit und ohne Vorbehandlung der 125J-Insuline durch NEM oder GSH.

250 µl 125J-Insulin (50 000 cpm) +/- Vorbehandlung mit NEM oder GSH (2 Tage bei + 4° C) entsprechend dem Inkubationsansatz in Abbildung 28 wurden vorgelegt und der RIA nit und ohne NEM nach 4.7.2. durchgeführt.

Probe	125J-Insulin	125J-Insulin mit Vorbehandlung NEM	GSH	RIA ohne NEM	RIA mit NEM
1	x			x	
2	x				x
3		x		x	
4			x	x	

untersucht. Abbildung 31 zeigt deren Autoradiographie. Demnach binden alle Reaktionsprodukte der 125J-Insuline, die durch NEM entstehen, an den Antikörper. Von der Intensität der Bandenher, scheint die Bindungsaffinität der Bande 3 und d etwas geringer zu sein. Außerdem reagiert NEM auch während der Einstellung des Bindungsgleichgewichtes mit Insulin, denn die Probe X zeigt ebenfalls die Bande zwei und drei. 125J-A14-Insulin zeigt nach GSH-Vorbehandlung, Immunpräzipitation und anschließender Dissoziation des Insulin-Antikörper-Komplexes nur die 125J-A14-Insulinbande. Demnach besitzt die A-Kette keine Immunreaktivität gegenüber dem eingesetzten Antikörper. Dies gilt ebenfalls für das CT-125J-Insulin. Bei CT-125J-Insulin tritt allerdings eine zusätzliche Bande auf. Es kann sich hier um ein A/B-Kettenpolymeres handeln (vgl. 5.7.2.1.).

Die strukturelle Veränderung von 125J-Insulin durch NEM

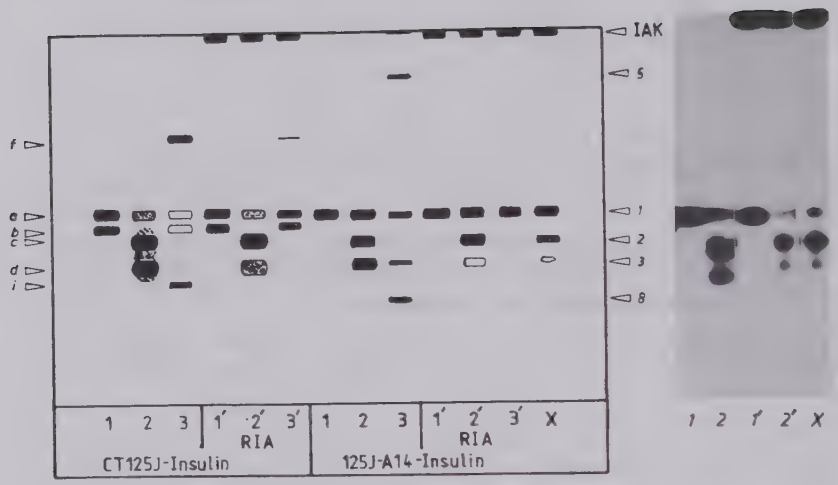


Abbildung 31: Vergleich von 125J-Insulinen mit und ohne Vorbehandlung durch NEM oder GSH auf ihre Immunreaktivität gegenüber Insulin-Antikörper.

16 % Acrylamid-Gele (nach 4.6.1.)

Die Inkubationsbedingungen entsprechen denen aus Tabelle 3. Es sind Proben vor (1-3) und nach (1'-3') Immunpräzipitation gegenübergestellt. Die Immunpräzipitate wurden in Probenpuffer gelöst und mit nat. Insulin (15 µM) dissoziiert. Je Probe wurden ca. 2500 cpm aufgetragen (vgl. 4.6.1.)

Probe	125J-Insulin	125J-Insulin mit Vorbehandlung durch NEM	GSH	RIA ohne NEM	RIA mit NEM
1	x			x	
2	x	x		x	
3	x		x	x	
X	x				x

Für 125J-A14-Insulin sind als optischer Vergleich die Photographie der Proben 1 und 2 bzw. 1' und 2' und die Probe X beigefügt.
Die mit Pfeil markierten Banden entsprechen denen in Abbildung 29.
IAK = Insulin-Antikörper-Komplex. Diese Markierung stellt gleichzeitig den Trenngel-Start dar.

hat demnach ohne Vorbehandlung keinen, jedoch mit Vorbehandlung einen Einfluß auf die Immunreaktivität. Die Differenz von 10 % Immunreaktivität, mit gegenüber ohne Vorbehandlung von 125J-Insulin mittels NEM, kann auf die Beteiligung einer Aminofunktion des Insulins, die zur Antikörperbindung notwenig ist, zurückzuführen sein. Dies könnte die geringere Bindungsaffinität der Bande 3 und d (Abb. 31) erklären.

Im Antigen-Antikörperkomplex können bestimmte Aminofunktionen des Insulins geschützt vorliegen und somit für NEM nicht mehr zugänglich sein. Die verbleibenden Aminofunktionen können durch NEM umgesetzt werden. Dadurch ist die Entstehung der Banden 2 und 3 (Abb. 31, Probe X) während der Einstellung des Bindungsgleichgewichtes zu erklären.

Eine vollständige Dissoziation von Insulin und Antikörper ist nicht zu erreichen. Der undissoziierte Insulin-Antikörper-Komplex läuft nicht in das Trenngel hinein und ist in der Abbildung 31 als IAK markiert.

5.7.2.1.3. Reaktion von NEM mit Insulin im sauren pH-Bereich

Proben, die zur Gelchromatographie an Sephadex G50 fine bestimmt waren, wurden zum Teil in 0,1 M HAc bei - 30° C aufbewahrt (vgl. 4.7.3.). Da NEM bei pH 7,4 und - 30° C mit Insulin reagiert, wurde die Reaktivität von NEM gegenüber Insulin unter den Lagerungsbedingungen für die Gelchromatographie überprüft. Hierbei konnte eine Reaktion ausgeschlossen werden, da nach Inkubation von 125J-A14-Insulin über 1 Woche bei + 4° C und - 30° C nur Bande 1 entsprechend der Abbildung 29 Probe E und keine der zusätzlichen Radioaktivitätsbanden auftraten.

5.7.2.2. Untersuchungen weiterer Abbauinhibitoren auf Wechselwirkungen mit Insulin

Bei Insulinrezeptorstudien mit Lebermikrosomen, deren Tritonextrakten oder zellulären Systemen werden häufig Substanzen eingesetzt, die den Insulinabbau hemmen. Der Einsatz von Insulinabbauinhibitoren ist notwendig, um fehlerhafte Bindungs- und Verdrängungsstudien auszuschließen. Untersuchungen über die Beeinflussung der Bindungseigenschaften von Insulin gegenüber Insulinrezeptor in Gegenwart verschiedener Inhibitoren brachte sowohl positive,als auch negative Bindungsbeeinflussungen mit sich (106, 107). So erniedrigen NEM, Jodacetamid und p-Chlormercuribenzoat die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor, während Dichlorphenol-Indophenol sie erhöht. Am Beispiel von NEM konnte gezeigt werden, daß eine Reaktion von Inhibitor mit dem Substrat vor sich geht, was die Beeinflussung des zu untersuchenden Systems ermöglicht. Daraufhin wurden die Insulinabbauinhibitoren Jodacetamid, Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid, p-Chlormercuribenzoat, Bacitracin, Dichlorphenol-Indophenol und o-Phenanthrolin entsprechend NEM auf Ihre Reaktivität gegenüber Insulin getestet. Abbildung 32 zeigt das Autoradiogramm von 125J-A14-Insulin nach Behandlung mit den entsprechenden Inhibitoren.

Demnach wurde nur durch NEM und Dichlorphenol-Indophenol 125J-A14-Insulin strukturell verändert. Bacitracin, o-Phenanthrolin, Jodacetamid, p-Chlormercuribenzoat und Phenyl-Methyl-Sulfonylfluorid zeigten auch nach drei Tagen Inkubation noch keine zusätzlichen Banden. Die Reaktion der Inhibitoren NEM und Dichlorphenol-Indophenol ist demnach eindeutig erwiesen. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß auch der Rezeptor oder Antikörper mit dem Inhibitor reagieren oder wechselwirken kann. Dadurch können ebenfalls die Bindungseigenschaften verändert werden.

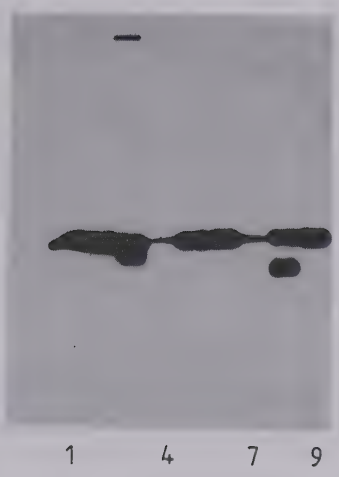


Abbildung 32: Autoradiogramm der PAGE von 125J-A14-Insulin nach Inkubation mit verschiedenen Insulinabbauinhibitoren.

16 % Acrylamid Gel (nach 4.6.1.)

Inkubationsansatz:

20 000 cpm 125J-A14-Insulin Schwein, in 0,1 M Tris/HCl pH 7,4/0,03 % Triton (Tris/HCl)
+ 10 µl Inhibitor 100 mM oder
+ 40 µl Inhibitor 25 mM
+ Tris/HCl ad 250 µl

Die Inhibitoren wurden in Tris/HCl gelöst. JAA, NEM, o-Phe 100 mM, Bac, DCPIP 25 mM, p-CMB, PMSF gesättigte Lösungen. PMSF und p-CMB sind in Wasser schwerlösich. Hier wurden 100 mg Inhibitor in 1 ml Dimehtylsulfoxid suspendiert und mit Tris/HCl auf 5 ml aufgefüllt. Vom Überstand der gessättigten Lösungen wurden die Proben entnommen (40 µl). Die Proben wurden bis zu 6 Tagen bei + 4° C inkubiert. Das Autoradiogramm zeigt die Proben nach 24 h Inkubation.

Probenauftragung:

Probe	cpm
1 = 125J-A14-Insulin	2500
2 = 125J-A14-Insulin + Bacitracin (Bac)	2500
3 = 125J-A14-Insulin + Dichlorphenol-Indophenol (DCPIP)	2500
4 = 124J-A14-Insulin Mensch	500
5 = 125J-A14-Insulin + p-Chlormercuribenzoat (p-CMB)	2500
6 = 125J-A14-Insulin + o-Phenanthrolin (o-Phe)	2500
7 = 1	500
8 = 125J-A14-Insulin + NEM	2500
9 = 125J-A14-Insulin + Jodacetamid (JAA)	2500

TS = Trenngelstart

5.7.3. Insulinabbauuntersuchungen mittels Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit den bisherigen Methoden ist noch keine eindeutige Klärung möglich, wieviel verschiedene Insulinabbauaktivitäten Lebermikrosomen enthalten. Ergänzend zur TCA-Fällung, dem RIA und der Gelchromatographie soll die PAGE nach Davis weitere Aussagen über die unterschiedlichen Insulinabbaubruchstücke ermöglichen.

5.7.3.1. Insulinabbauuntersuchungen an Lebermikrosomen, Lebermikrosomenextrakten und XAD-Eluat-Überständen

Die bisherigen Untersuchungen von Insulin mittels PAGE haben gezeigt, daß NEM bei pH 7,4 mit Aminofunktionen von Insulin reagiert. Diese Reaktion geht langsam vor sich, während die SH-Funktionen durch NEM sofort umgesetzt werden. Im sauren pH-Bereich (pH 3,0) findet keine Umsetzung der Aminofunktionen durch NEM statt. Auch GSH reagiert mit Insulin. Es entstehen verschiedene Produkte durch die reduktive Spaltung. Der Vergleich dieser Produkte (mit GSH erhalten), mit den Abbauprodukten, die durch LM, LME und XADEÜ gebildet werden, soll zeigen, ob reduktive, proteolytische oder beide Abbaumechanismen vorliegen.

In Anwesenheit und Abwesenheit von GSH und nativem Insulin wurden LM, LME und XADEÜ auf die Entstehung von Insulinabbauprodukte untersucht. Hierbei wurden die Proben mit Insulinabbau direkt oder nach Stoppen mit NEM auf die Elektrophorese aufgetragen. Abbildung 33 zeigt die Bandenmuster der Abbauprodukte ohne Stoppen durch NEM. Hieraus ist zu ersehen, daß unter den Bedingungen $\pm$ GSH, $\pm$ nat. Insulin für LM, LME und XADEÜ die entstehenden Bandenmuster gleich sind, wobei nur Unterschiede in der Stärke der einzelnen Banden auftreten. Die Bande sieben entsteht nur, wenn kein nat. Insulin im Ansatz war. Mit Ausnahme von XADEÜ tritt die Bande 1 nur mit GSH im Ansatz auf. Bei XADEÜ ist sie

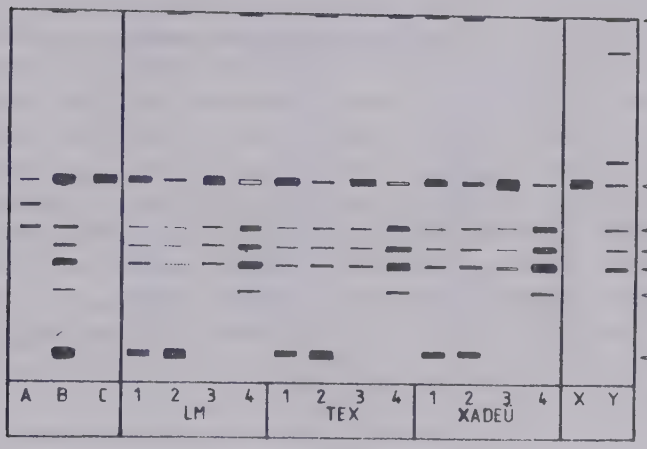


Abbildung 33: Autoradiogramm der PAGE von 125J-A14-Insulin nach Abbau durch LM, LME oder XADEÜ.

Inkubationsansatz:

50 000 cpm 125J-A14-Insulin Schwein, in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton (Tris/HCl)
\+ 50 µl Abbauaktivität (LM, LME, XADEÜ)
+/- 10 µl natives Insulin, 1 mg/ml
+/- 10 µl GSH, 10 mM
\+ Tris/HCl ad 250 µl

Nach Inkubation (1h bei +30° C) wurden die Proben direkt auf die Elektrophorese aufgetragen .

16 % Acrylamid Gel (nach 4.6.1.)

Proben im Ansatz:

1 = Abbauaktivität
2 = Abbauaktivität + GSH (0,4 mM)
3 = Abbauaktivität + nat. Insulin (7 µM)
4 = Abbauaktivität + GSH + nat. Insulin (0,4 mM/7 µM)
pro Tasche wurden 2500 cpm aufgetragen.
A = Bandenmuster von 125J-A14-Insulin nach Behandlung durch NEM (vgl. Abb. 29/G)
B = Alle Banden, die durch Abbau von LM, LME oder XADEÜ entstehen
X = 125J-A14-Insulin
Y = Bandenmuster von 125J-A14-Insulin nach Behandlung durch GSH (vgl. Abb. 29/H)

auch ohne GSH im Ansatz nachweisbar. Bei Bande 1 handelt es sich wahrscheinlich um Aggregate, die nicht in das Trenngel hineinlaufen. Nach Einwirkung von GSH auf Insulin, bei 30° C, treten keine zusätzlichen Banden, außer der 125J-Insulinbande selbst (Probe C und X) auf. Die bei LM, LME und XADEÜ auftretenden Banden sind demnach auf Insulinabbauaktivität zurückzuführen. Zum Vergleich sind in der Abbildung die durch Einwirkung von GSH auf 125J-Insulin entstehenden Banden (Probe Y) dargestellt. Die zusätzlichen Banden 6 und 7 müssen auf eine andere Reaktion zurückzuführen sein, die nicht über reduktive Spaltung abläuft. Hierfür kommt der proteolytische Abbau in Frage. Bei Bande 3, 4 und 5 kann es sich demnach um reduktive Spaltprodukte des 125J-Insulins handeln, die durch LM, LME und XADEÜ erzeugt werden.

Abbildung 34 zeigt die Bandenmuster nach Stoppen durch NEM. Die NEM-Zugabe nach Inkubation sollte den Insulinabbau hemmen und sämtliche SH-Funktionen blockieren, wodurch sich eine Veränderung der Laufeigenschaften von entsprechenden Insulinfragmenten ergeben kann. Bei der Insulinspaltung durch GSH (2 Tage bei + 4° C), nach Stoppen durch NEM, treten die drei zusätzlichen Banden 8, 9 und 10 auf (vgl. Probe A und B). Die Addition von NEM an freie SH-Funktionen verändert demnach die Laufeigenschaften der reduktiv gebildeten Produkte. An freie Amino-Funktionen wird in der kurzen Zeit nichts addiert. Das Auftreten verschiedener Banden bestätigt die in 5.7.2.1. dargestellten Ergebnisse (Abb. 29). Es kann demnach nicht nur vollständig reduzierte A- und B-Kette vorliegen, da sonst nur vollständig, vierfach mit NEM belegte 125J-A-Kette auftreten dürfte. Bei unveränderten Banden (3, 4 und 5) kann es sich um Produkte ohne freie SH-Funktionen handeln.

Die durch LME erhaltenen Abbauprodukte zeigen nach Stoppen durch NEM ähnliches Verhalten. Der Vergleich der Proben C und D zeigt das zusätzliche Auftreten der Banden 8 - 12,

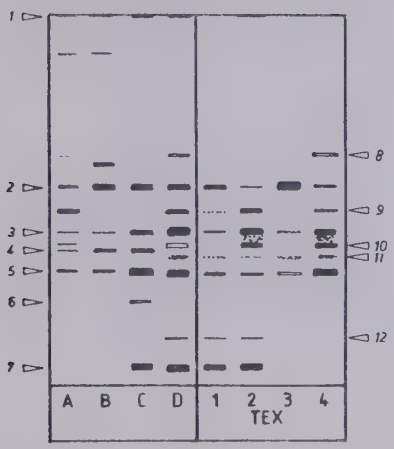


Abbildung 34: Vergleich der 125J-A14-Insulin-Abbaubandenmuster von Lebermikrosomenextrakt, mit und ohne Stoppen des Inkubationsansatzes durch NEM.

Der Inkubationsansatz entspricht dem in Abbildung 33. Nach Inkubation (1 h + 30° C) wurden die Proben mit NEM gestoppt (10 µl NEM 100 mM) und direkt auf die Elektrophorese aufgetragen.

16 % Acrylamid Gel (nach 4.6.1.)

Proben im Ansatz:

1 = LME
2 = LME + GSH (0,4 mM)
3 = LME + nat. Insulin (7 µM)
4 = LME + GSH + nat. Insulin (0,4 mM/7µM)

A = entspricht B mit anschließendem Stoppen durch NEM
B = Bandenmuster von 125J-A14-Insulin nach Behandlung durch GSH (vgl. Abb. 29/H)
C = Alle Banden, die durch Abbau mit LM, LME oder XADEÜ entstehen; ohne Stoppen durch NEM (vgl Abb. 33/B)
D = Alle Banden, die durch Abbau mit LM, LME oder XADEÜ entstehen; mit Stoppen durch NEM

während die Banden 4 und 6 verschwinden. Die Banden 1, 3, 5 und 7 bleiben erhalten. Bei den unveränderten Banden kann es sich um proteolytische Fragmente oder Bruchstücke ohne freie SH-Funktionen handeln. Bei den zusätzlich auftretenden Banden (7, 11 und 12), die nicht durch GSH-Einwirkung auf Insulin erhalten werden, handelt es sich sicher um proteolytische Abbauprodukte.

In Abbildung 34 sind nur die Bandenmuster von LME dargestellt, da auch hier (vgl. Abb. 33) für LM, LME und XADEÜ die Bandenmuster gleich sind, wobei einzelne Banden stärker oder schwächer auftreten. Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, daß während der Aufarbeitung keine der Abbauaktivtät verloren geht (vgl. 5.3.2.3.).

5.7.3.2. Elektrophorese der Insulinabbaubruchstücke nach Gelfiltration

Nach Gelfiltration der Insulinabbaubruchstücke von 125J-Insulin (durch LM, LME, XADEÜ, Aktivität B1, B2 und C produziert) erhält man verschiedene Abbaupeaks mit 125J-Insulinabbaubruchstücken. Die einzelnen Peaks erlauben nur eine Aussage über das Molekulargewicht der erhaltenen Abbauprodukte. Die PAGE dieser Abbauprodukte und deren Zuordnung zu entstehenden Banden auf der Elektrophorese soll zur Klärung der Frage beitragen, wieviel unterschiedliche Abbauaktivitäten LM enthalten.

Alle untersuchten Proben wurden mit NEM gestoppt und unter sauren Bedingungen aufbewahrt, damit keine Reaktion von Aminofunktionen mit NEM stattfinden können. Um die Insulinabbaubruchstücke nach Gelfiltration an Sephadex G50 fine (5.3.2) den Banden der Elektrophorese zuordnen zu können, wurden die Spitzenfraktionen der eluierten Peaks lyophilisiert und auf der Elektrophorese aufgetrennt. Pro Abbaupeak wurden bis zu 2500 cpm pro Tasche aufgetragen. Dadurch

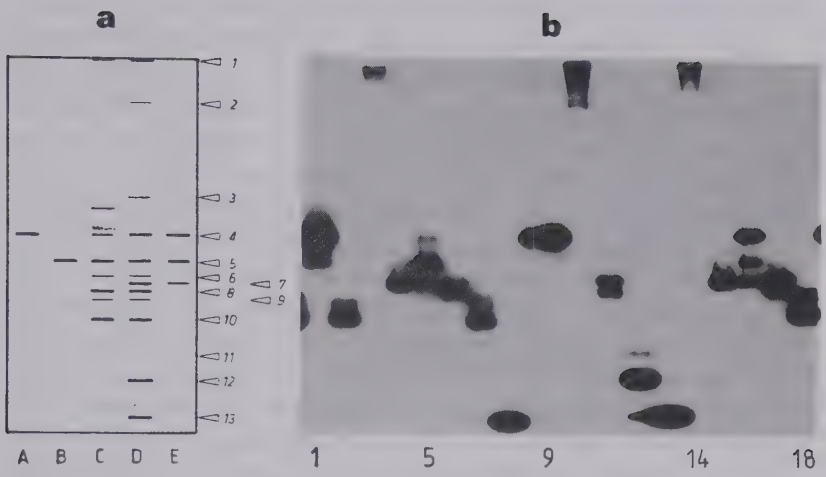


Abbildung 35: Vergleich der 125J-A14-Insulin-Abbaubandenmuster von LM, LME und XADEÜ nach Gelchromatographie der 125J-A14-Insulin-Abbauprodukte und PAGE der Abbauprodukte aus den verschiedenen eluierten Abbaupeaks.

Der Inkubationsansatz entspricht dem in Abbildung 34. Nach Inkubation (1 h + 30° C) wurden die Proben mit NEM gestoppt, mit HAc versetzt und an Sephadex G50 fine chromatographiert (vgl. 4.7.3.). Die Spitzenfraktionen der Peaks mit 125J-A14-Insulin-Abbaubruchstücken wurden lyophilisiert, in Probenpuffer aufgenommen und elektrophoretisch aufgetrennt.

16 % Acrylamid Gel (nach 4.6.1.)

a: Zeigt eine Gegenüberstellung der Radioaktivitätsbanden, die durch reduktive Spaltung mittels GSH und DTE erhalten werden oder durch Insulinabbauaktivitäten erzeugt werden.

A = 125J-A14-Insulin
B = 125J-(Tyr14)-A-Kette; 125J-A14-Insulin wurde mit 10 mM DTE im Ansatz zwei min. gekocht, mit NEM gestoppt und direkt auf die PAGE aufgetragen (1000 cpm).
C = 125J-A14-Insulin-Abbaubanden, die durch reduktive Spaltung mit GSH (2 Tage bei + 4° C) und anschließendem Stoppen durch NEM auftreten.
D = Alle Banden, die durch LM, LME oder XADEÜ erzeugt werden
E = Banden, die durch Einwirkung von NEM auf 125J-Insulin auftreten (vgl. Abb. 29 Probe F).

b: Zeigt Radioaktivitäts-Bandenmuster, die in den einzelnen Peaks nach Gelfiltration der 125J-A14-Insulin-Abbaubruchstücke auftreten.

Fortsetzung der Legende Abbildung 35 B:

	Proben	Peak	Fraktion
1	LME + nat. Insulin (7µM)	4	45
2	"	6	60
3	LME + GSH (0,4 mM)	1	30
4	"	3	40
5	"	4	45
6	"	5	55
7	"	6	60
8	"	8	84/85
9	125J-A14-Insulin	4	45
10	XADEÜ + GSH (0,4 mM)	1	30
11	"	5	55
12	"	7	72/73
13	"	8	84/85
14	XADEÜ + GSH + nat. Ins. (0,4 mM/7 µM)	1	30
15	"	3	40
16	"	4	45
17	"	5	55
18	"	6	60

Peak und Fraktionszuordnung vgl. Tabelle 4.

ergeben sich bei Peak-Fraktionen teilweise stärkere Banden im Vergleich zur Gesamtprobe. Für LM, LME und XADEÜ treten nach PAGE der einzelnen Peak-Fraktionen insgesamt 13 Banden auf (Abb. 35). Bei deren Gesamt-Proben treten insgesamt 12 Banden auf (Abb. 34. Im folgenden Schema sind die Banden der Gesamt-Proben denen der Peak-Fraktionen gegenübergestellt:

Gesamt-Probe:	1	-	8	2	9	3	-	10	11	5	-	12	7
Peak-Fraktion:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13

Bei Zuordnungen von Banden wird im Folgenden die Durchnummerierung nach ihren R_F-Werten (Abb. 35) verwendet. Bis auf Bande 2, 7 und 11 treten alle anderen Banden in der Gesamt-Probe auf, die auch in den Peak-Fraktionen gefunden werden. Das Fehlen der Bande 7 in der Gesamt-Probe ist auf die geringe R_F-Wert-Differenz der Bande 6 und 7 zurückzuführen. Die Bande 6 und 7 sind außerdem sehr stark und überdecken sich demnach in der Gesamt-Probe (vgl. Abb. 34 u. 35). Die Bande 6 der Gesamt-Probe tritt mit NEM-gestoppten Proben

nicht auf. Die Bande 2 und 7 sind in den Peak-Fraktionen nur schwach vertreten und erscheinen deshalb nicht in der Gesamt-Probe (vgl. oben). Als optischer Vergleich sind in Abbildung 35 B die Autoradiographien der Radioaktivitätsbanden von Elektrophoresen nach Gelfiltretion der Insulinabbaubruchstücke dargestellt. Es wurde auszugsweise XADEÜ und LME unter den Bedingungen + GSH $\pm$ nat. Insulin gewählt. In Tabelle 4 sind für LM, LME und XADEÜ die R_F-Werte von allen Banden die den entsprechenden Peaks nach Gelfiltration zuzuordnen sind zusammengestellt. Daraus geht hervor, daß die Peaks keine einheitlichen Bruchstücke enthalten. Der Peak 4 (Insulinpeak) besitzt nach PAGE die drei Banden 4, 5 und 7. Peak 5 zeigt Bande 6 und 8, Peak 6 zeigt Bande 9 und 10. Die Banden aus Peak 1 (AV) besitzen alle kleinere R_F-Werte als die Insulinbande. Die Peaks 3, 7 und 8 sind einheitlich und entsprechen den Banden 7, 12 und 13. Zum Fall von Bande 7 besitzt ein Insulinabbaubruchstück, welches vom Molekulargewicht her größer ist als Insulin, nach PAGE einen kleineren R_F-Wert. Der Vergleich der Bandenmuster gleicher Peak-Fraktionen von LM, LME und XADEÜ (Elutionsprofile siehe Abb. 12 - 14) ergeben gleiche Banden unter den selben Bedingungen ($\pm$ GSH, $\pm$ nat. Insulin). Beim XADEÜ ist der Peak 7 sehr groß, ihm entspricht die Bande 12, die auch bei LME (Abb. 34) auftritt.

Tabelle 4: Zuordnung von Radioaktivitätsbanden der Abbauprodukte von 125J-A14-Insulin, zu Abbaupeaks nach Gelfiltration der 125J-A14-Insulin-Bruchstücke, die durch LM, LME oder XADEÜ erzeugt werden.

Der Inkubationsansatz entspricht dem aus Abbildung 33. Nach Inkubation bei + 30° C wurden die Proben mit NEM gestoppt und an Sephadex G50 fine chromatographiert (nach 4.7.3.). Die Spitzenfraktionen der Peaks mit 125J-A14-Insulin-Bruchstücken wurden lyophilisiert, in Probenpuffer aufgenommen und elektrophoretisch (nach 4.6.1) aufgetrennt. Die Zuordnung der Peaks ist aus Kap. 5.3.2.3. (Abb. 12 - 14) zu ersehen.

Peak	Fraktion	R_F-Wert												
LM		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	30	0												
4	45				5,65			7,15						
6	60									7,75	8,35			
8	84/85													11,5
LM/GSH														
8	84/85													11,5
LM/nat. Ins.														
4	45				5,65	6,5		7,15						
6	60									7,75	8,35			
LM/GSH/n.I.														
1	30	0												
3	40							7,15						
4	45				5,65	6,5		7,15						
5	55						7,0		7,45					
6	60									7,75	8,35			
LME														
1	30	0												
4	45				5,65	6,5		7,15						
6	60									7,75	8,35			
8	84/85													11,5
LME/GSH														
1	30	0												
3	40							7,15						
4	45				5,65	6,5		7,15						
5	55						7,0		7,45					
6	60									7,75	8,35			
8	84/85													11,5
LME/n.I.														
4	45				5,65	6,5		(7,15)						
6	60									7,75	8,35			
LME/GSH/n.I.														
1	30	0		4,4										
3	40							7,15						
4	45				5,65	6,5		7,15						
5	55						7,0		7,45					
6	60									7,75	8,35			
XADEÜ														
1	30	0												
4	45				5,65	6,5								
6	60									7,75	8,35			
7	72/73												10,3	
8	84/85													11,5
XADEÜ/GSH														
1	30	0	1,4											
5	55						7,0		7,45					
7	72/73											9,5	10,3	
8	84/85													11,5
XADEÜ/n.I.														
4	45				5,65	6,5								
XADEÜ/GSH/n.I.														
1	30	0	1,4	4,4										
3	40							7,15						
4	45				5,65	6,5		7,15						
5	55						7,0		7,45					
6	60									7,75	8,35			

Tabelle 4:

Abbildung 35 a zeigt eine Gegenüberstellung der durch Reduktion von 125J-Insulin durch GSH entstehenden Banden in Vergleich zu den Banden des Insulinabbaus durch LM, LME und XADEÜ. Zusätzlich zu den reduktiv erzeugbaren Banden (1, 2, 5, 6, 8, 9 und 10) treten nach Abbau von 125J-Insulin durch LM, LME oder XADEÜ die Banden 3, 7, 11, 12 und 13 auf. Nach Reduktion von 125J-Insulin durch Kochen mit DTE (10 mM) und direktes Stoppen der Inkubationslösung mit NEM erhält man nach PAGE nur die Bande 5. Es handelt sich hier um 125J-(Tyr14)-A-Kette. Die vier SH-Funktionen sind durch vier Moleküle NEM blockiert. Die Entstehung der zusätzlichen Banden nach GSH-Behandlung läßt sich wie in 5.7.2.1. durch mögliche Rekombinationen von SH-Funktionen erklären. Das wird auch dadurch unterstützt, daß die Peaks 5 und 6, die durch Inkubation von 125J-Insulin mit LM oder LME mit GSH und nat. Insulin im Ansatz entstehen, nach Reduktion mittels DTE (10 mM) durch Kochen und anschließendem Stoppen durch NEM auf der PAGE ebenfalls nur Bande 5 ergeben.

Die hier aufgeführten Ergebnisse lassen folgende Aussagen zu: Die Peaks 7 und 8 nach Gelfiltration erhalten, stellen Abbauprodukte mit Molekulargewicht kleiner 2000 dar. Diesen Peaks kann man die Banden 11, 12 und 13 zuordnen. Es handelt sich um proteolytische Spaltprodukte von Insulin. Durch GSH wird 125J-Insulin zu 80 % reduktiv gespalten (2 Tage bei + 4° C). Es treten verschiedene Abbauprodukte auf. Banden die R_F-Werten der reduktiven Abbauprodukte von Insulin (Bande 5, 6, 8, 9 und 10) entsprechen, werden durch reduktiv spaltende Abbauaktivitäten gebildet. Auch die Molekulargewichtsbereiche der entsprechenden Abbaupeaks liegen oberhalb 2000. Peaks,die Abbauprodukte mit Molekulargewicht größer 2000 enthalten, deren Banden keiner durch Reduktion erzeugbaren Bande zuzuordnen sind, müssen proteolytisch entstehen (Bande 3 und 7). Die LM enthalten demnach reduktiv sowie proteolytisch spaltende Abbauaktivität.

Der Nachweis der 125J-Insulinbruchstücke durch Gelfiltration, die durch die Aktivität B1, B2 oder C erzeugt werden, und die anschließende Elektrophorese der Insulinbruchstücke aus den Peaks der Gelfiltration, sollten an Hand dieser Ergebnisse die Klärung ermöglichen, ob es sich hier um drei verschiedene Insulinabbauaktivitäten handelt. Tabelle 5 zeigt alle durch die Abbauaktivitäten B1, B2 und C erzeugten Radioaktivitätsbanden mit ihren R_F-Werten.

Von der Gelfiltration her zeigt die Aktivität B1 ein anderes Elutionsprofil (Abb. 15) als LM, LME oder XADEÜ (Abb. 12 - 14). Auch die Bandenmuster der Peaks 6 und 7 sind im Vergleich zu LM, LME oder XADEÜ verändert (Tab. 4 und 5). Außer der Inkubationsbedingung, bei der nur nat. Insulin im Ansatz vorhanden ist, tritt immer Peak 7 mit dessen typischen Bande 12 auf, die ein proteolytisches Abbauprodukt darstellt. Ohne GSH und ohne nat. Insulin im Ansatz treten im Peak 6, neben den Banden 6, 9 und 10 die zusätzlichen Banden 3a, 3b und 10 a auf, die keine reduktiven Abbaubruchstücke darstelltn. Mit GSH sowie mit GSH und nat. Insulin im Ansatz fehlen die für die reduktive Spaltung typischen Peaks 5 und 6 mit den Banden 6 und 8 (Peak 5) und Bande 9 und 10 (Peak 6), die bei LM, LME und XADEÜ (Tab. 4) auftreten (diese treten bei Aktivität C auf, siehe unten). Mit nat. Insulin im Ansatz entsteht nur Peak 4, der die Banden 4 und 5 aufweist, die bei allen vier Inkubationsbedingungen auftreten. Die Banden 6, 9 und 10, die wie oben erwähnt, typische reduktive Banden darstellen, treten unter der Inkubationsbedingung ohne GSH im Ansatz für Aktivität B1 ebenfalls auf. Das Entstehen von proteolytischen Abbauprodukten, die gleiche R_F-Werte besitzen, wie Banden die durch Reduktion entstehen, ist nicht auszuschließen. Für Aktivität B2 entstehen ohne GSH, mit und ohne nat. Insulin im Ansatz die gleichen Peaks (Abb. 16) und Bandenmuster wie für Aktivität B1. Mit GSH, sowie mit GSH und nat. Insulin im Ansatz treten die Peaks und Bandenmuster entsprechend dem LME oder XADEÜ auf. Bei Aktivität C mit und ohne

Peak	Fraktion	R_F-Wert												
		1	3	3a	3b	4	5	6	7	8	9	10	10a	12
B1														
4	45					5,65	6,5							
6	60			5,0	5,5			7,0			7,75	8,35	8,9	
7	72/3													10,3
B1/GSH														
4	45					5,65	6,5							
6	60							7,0						
7	72/73													10,3
B1/n.I.														
4	45					5,65	6,5							
B1/GSH/n.I.														
4	45					5,65	6,5							
6	60					(5,65)	6,5	7,0		7,45				
7	72/73													10,3
B2														
4	45					5,65	6,5							
6	60			5,0	5,5			7,0			7,75	8,3	8,9	
7	72/73													10,3
B2/GSH														
1	30	0												
3	40								7,15					
4	45					5,65	6,5		7,15					
5	55							7,0		7,45				
6	60										7,75	8,35		
7	72/73													10,3
8	84/85	Bande 13, R_F-Wert 11,5												
B2/n.I.														
4	45					5,65	6,5							
B2/GSH/n.I.														
1	30	0												
3	40								7,15					
4	45					5,65	6,5		7,15					
5	55							7,0		7,45				
6	60										7,75	8,35		
C														
4	45					5,65								
C/GSH														
1	30	0												
2	35								7,15					
3	40					5,65	6,5							
4	45							7,0		7,45				
5	55										7,75	8,35		
C/n.I.														
4	45					5,65								
C/GSH/n.I.														
1	30	0												
2	35								7,15					
3	40					5,65	6,5							
4	45							7,0		7,45				
5	55										7,75	8,35		

Tabelle 5:

Tabelle 5: Zuordnung von Radioaktivitätsbanden der Abbauprodukte von 125J-A14-Insulin, zu Abbaupeaks nach Gelfiltration der 125J-A14-Insulin-Bruchstücke, die durch die Abbauaktivitäten B1, B2 oder C erzeugt werden.

Inkubationsansatz:

50 000 cpm 125J-A14-Insulin Schwein, in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton (Tris/HCl)
\+ 50 µl Aktivität (B1, B2 oder C)
+/- 10 µl GSH 10 mM
+/- 10 µl nat. Insulin, 1 mg/ml
\+ Tris/HCl ad 250 µl

Nach Inkubation (1 h bei + 30° C) wurden die Proben mit NEM gestoppt und an Sephadex G50 fine chromatographiert. Die Spitzenfraktionen der Peaks mit 125J-Insulin-Bruchstücken wurden lyophilisiert, in Probenpuffer aufgenommen und elektrophoretisch aufgetrennt (nach 4.6.1.). Die Zuordnung der Peaks ist aus Kap. 5.3.2.3. (Abb. 15 - 17) zu ersehen. Es wurden 16 % Acrylamid Gele verwendet. Die Gelchromatographie erfolgte nach 4.7.3..

nat. Insulin im Ansatz entsteht nur der Peak 4 (Abb. 17), der nach PAGE nur die Bande 4 (125J-Insulin) aufweist. Mit GSH im Ansatz erhält man gleiche Peaks und gleiche Bandenmuster wie mit GSH und nat. Insulin im Ansatz. Bis auf die Bande 7 treten nur Banden auf, die durch reduktive Spaltung erreicht werden können. Vom Elutionsprofil der Gelchromatographie her tritt eine Verschiebung der eluierten Peaks auf. Der mit zwei bezeichnete Peak (vgl. 5.3.2.3.) entspricht vom Bandenmuster der PAGE dem Peak 3. Das gleiche gilt für die folgenden Peaks, so daß die Peaks 2, 3, 4 und 5 in Tabelle 5 bzw. Abb. 17 tatsächlich den Peaks 3, 4, 5 und 6 in Tabelle 4 bzw. Abb. 12 - 14 zuzuordnen sind.

Die PAGE in Kombination mit der Gelchromatographie ermöglicht eindeutige Aussagen über den Mechanismus der Entstehung (proteolytisch oder reduktiv) von Insulinabbauprodukten. Verschiebungen von Abbaupeaks während der Gelfiltration lassen sich durch deren typischen Bandenmuster nach PAGE nachweisen. Die Summe der Abbauaktivitäten in LM, LME oder XADEÜ zeigen unter den verschiedenen Inkubationsbedingungen andere Peaks und Bandenmuster als die Aktivitäten B1 und

C. Die Aktivität B2 stellt eine Ausnahme dar. Dies kann auf nebeneinander ablaufenden oder nacheinander geschalteten Insulinabbau, durch die einzelnen Aktivitäten in LM, LME oder XADEÜ zurückzuführen sein.

Demnach handelt es sich bei Aktivität B1 um eine proteolytische Aktivität. B2 stellt eine Mischung aus B1 und C dar und die Aktivität C spaltet Insulin reduktiv (vgl.hierzu auch Kap. 5.3.2.3., 5.5 und 5.6).

5.7.3.3. Insulinabbauuntersuchungen an Plasmamembranen von Hepatozyten mittels PAGE

Lebermikrosomen stellen eine sehr uneinheitliche Fraktion von Membranbestandteilen aus Hepatozyten dar. Plasmamembranen, glattes sowie rauhes Endoplasmatisches Retikulum, Teile des Golgi-Apparates und andere vesikuläre Partikel sind darin nachweisbar (40). Von verschiedenen Arbeitsgruppen (51, 162) wurden Insulinabbauenzyme in Plasmamembranen nachgewiesen. Aus diesem Grund wurden auch hier Plasmamembranen auf ihren 125J-Insulinabbau untersucht. Die Plasmamembranen wurden von Herrn Deger zur Verfügung gestellt und nach der Methode von Stein, Wednell und Stein (146) modifiziert nach (40, 55) hergestellt.

Der Gesamtabbau der Plasmamembranen betrug nur 20 % der Abbauaktivität von Lebermikrosomen (TCA-Fällung, RIA), bei gleichem Proteingehalt der Proben. Tabelle 6 zeigt die R_F-Werte der 125J-Insulin-Peaks nach PAGE. Das Bandenmuster der 125J-A14-Insulinbruchstücke der Peaks nach Gelchromatographie, produziert von Plasmamembranen entspricht dem von Lebermikrosomen (Tab. 6). Auch die Zuordnung der eluierten Peaks nach Gelchromatographie ist gleich (nicht gezeigt). Demnach besitzen die Plasmamembranen ebenfalls die beiden

Peak	Fraktion	R_F-Wert												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
PM														
1	30	0												
4	45				5,65	6,5		7,15						
6	60									7,75	8,35			
8	84/85													11,5
PM/GSH														
1	30	0												
4	45				5,65	6,5		7,15						
5	55						7,0		7,45					
8	84/85													11,5
PM/n.I.														
4	45				5,65	6,5								
6	60									7,75	8,35			
PM/GSH/n.I.														
1	30	0												
4	45				5,65	6,5		7,15						
5	55						7,0		7,45					
6	60									7,75	8,35			

Tabelle 6: Zuordnung von Radioaktivitätsbanden der Abbauprodukte von 125J-A14-Insulin, zu Abbaupeaks nach Gelfiltration der 125J-A14-Insulin-Bruchstücke, die durch Plasmamembranen erzeugt werden. Die Inkubationen und Aufarbeitungen wurden analog Tab. 4 durchgeführt. Die Plasmamembran-Proteinkonzentration wurde auf den Proteingehalt der LM eingestellt. PM = Plasmamembran

Insulinabbauaktivitäten B1 und C. Der Peak 3 nach Gelfiltration war nur als Schulter des 125J-Insulin-Peaks 4 vorhanden und wurde nicht elektrophoretisch untersucht.

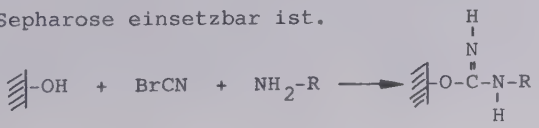
5.8. Affinitätschromatographie der Insulinabbauaktivitäten B1 und C

Als weiterer Reinigungsschritt für die beiden Insulinabbauaktivitäten B1 und C wurde die Affinitätschromatographie angewandt. Es war die Kopplung von Thiolen oder Insulin an ein Trägermaterial möglich. Die Kopplung von Insulin an ein Trägermaterial wurde aus folgenden Gründen nicht in Erwägung gezogen:

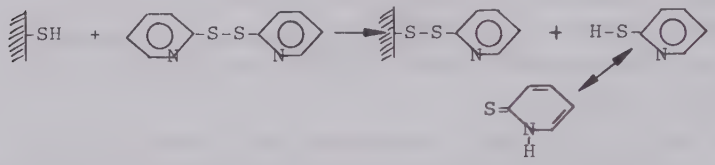
a) Insulin, gekoppelt an Trägermaterial, kann von der Abbauaktivität während der Chromatographie zerstört werden. Inaktiviertes Trägermaterial ist für weitere Untersuchungen unbrauchbar.
b) Die Insulinabbauaktivitäten sollten reversibel hemmbar sein, um in der aktiven Form eine Zerstörung des Trägermaterials zu verhindern. Die bisher verwendeten Abbauinhibitoren (SH-Blocker) bedingen eine irreversibele Hemmung der Abbauaktivitäten.

Wie aus den vorangegangenen Versuchen hervorgeht, ist die Abbauaktivität B1 GSH-aktivierbar und Abbauaktivität C ist GSH-abhängig. Beides bedingt ein Vorhandensein von SH-Funktionen am Protein. In der Literatur (14, 15, 79, 80) sind bereits Trennungen von Proteinen mit SH-Funktionen über Disulfidaustauschreaktionen beschrieben. Ein weiterer Vorteil des Arbeitens mit SH-aktiviertem Trägermaterial ist bedingt durch die kovalente Bindung des Proteins an das Trägermaterial, wobei die Disulfidbindungen vollständig reversibel sind.

Als SH-Reagenz wurde GSH gewählt, da es einerseits für beide Abbauaktivitäten als Co-Substrat dient und zum anderen in der oxidierten Form (GSSG), also SH-geschützt mit seinen zwei freien Amino-Funktionen als gutes Kopplungsreagenz für CNBr-Sepharose einsetzbar ist.



Die Kopplung von GSSG selbst geht im basischen unter Abspaltung von HBr und Ausbildung einer Isoharnstoff-Gruppierung vor sich. Das so gebundene GSSG wurde reduziert und mit 2,2'-Dipyridyl-Disulfid aktiviert.



Während der Chromatographie wird unter Disulfidaustausch das Mercaptopyridin freigesetzt und das Protein, welches in der SH-Form vorliegen muß, wird gebunden. Das Protein kann anschließend durch Reduktionsmittel, wie Cystein, GSH oder Dithioerythrit eluiert werden. Um die oxidative Wirkung von Luftsauerstoff auf reduzierte Verbindungen zu verhindern wurde mit N_2 gesättigten Lösungen und unter N_2-Begasung gearbeitet.

Unter den Bedingungen der Methode 4.11. konnte von Abbauaktivität C (aus dem DEAE-Sephadex A50-Säulenlauf) keinerlei Bindung an das Trägermaterial nachgewiesen werden. Der Insulinabbau wurde hier quantitativ durch TCA-Fällbarkeit bestimmt, wobei sämtliche Abbauaktivität im Durchlauf wiedergefunden wurde. Der Durchlauf, sowie die Cystein, GSH und Dithioerythrit-Eluate wurden außerdem mittels SDS-PAGE auf mögliche Veränderungen des Proteinbandenmusters untersucht. Die drei Thiol-Eluate wiesen keine Proteinbanden auf und der Durchlauf zeigte das gleiche Bandenmuster wie vor der Affinitätschromatographie. Auch die Veränderung der Auftragsbedingungen (pH 6, 7 und 8) ermöglichte keine Bindung von Aktivität C an das Gelmaterial. Eine Bindung der oxidierten Proteine an das reduzierte Gelmaterial (SH-Form) war ebenfalls erfolglos. Der Grund hierfür könnte mit der Zugänglichkeit der SH-Funktionen am Protein zusammenhängen. Sie SH-Funktionen könnten einerseits geschützt vorliegen

und nur von frei zur Verfügung stehendem GSH erreichbar sein, oder das Enzym benötigt eine Konformationsänderung durch das zweite Substrat (Insulin), um die SH-Funktion zugänglich zu machen.

Die Affinitätschromatographie von Abbauaktivität B1 (aus dem DEAE-Sephadex A50-Säulenlauf) erbrachte eine Reinigung. Nach Auftragen der Aktivität B1 wurde ein Protein an das Gelmaterial gebunden. Das restliche Protein läuft durch. Das gebundene Protein konnte mit Cystein im Elutionspuffer eluiert werden.

Probe	Protein im Ansatz (µg)	% TCA-Löslichkeit	Abbau % RIA
1	10	12	70
2	10	8	60
3	5	-	10

Tabelle 7: 125J-A14-Insulinabbau nach Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose von Aktivität B1.
Zur Durchführung der Affinitätschromatographie vgl. 4.11..

Inkubationsansatz:

50 000 cpm 125J-A14-Insulin Schwein, in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4/0,03 % Triton (Tris/HCl)
\+ Probe 1, 2 oder 3
\+ 10 µl GSH, 10 mM
\+ Tris/HCl ad 250 µl
Nach Inkubation (1 h bei + 30° C) wurde wie unter 4.7.1/2. weiter verfahren.

1 = Probe vor Affinitätschromatographie
2 = Durchlauf nach Affinitätschromatographie
3 = Cystein-Eluat

In Tabelle 7 sind die Werte des Insulinabbaus vor und nach der Affinitätschromatographie dargestellt. Demnach wurde nur ein sehr geringer Anteil der Abbauaktivität an das Säulenmaterial gebunden, da sich die Insulinabbauaktivität hauptsächlich im Durchlauf der Affinitätschromatographie befindet.

Das gebundene Protein (Eluat 2) und der Durchlauf (Eluat 1) wurden mittels SDS-PAGE auf ihr Proteinbandenmuster untersucht. Eluat 2 besitzt nach SDS-PAGE im nicht reduzierten Zustand ein MG von 56 000, gleich Bande 4 (Abb. 19 A, Probe 14) und im reduzierten Zustand ein MG von 68 000 gleich Bande 6 (Abb. 19 B, Probe 14). Das Eluat 1 entspricht dem Durchlauf der Affinitätschromatographie und entspricht in Abb. 19 der Probe 13.

5.9. Präparative Elektrophorese der Insulinabbauaktivitäten B1 und C

Da mittels Affinitätschromatographie keine positiven Ergebnisse bezüglich der Reinigung der Insulinabbauaktivitäten zu erreichen war, wurde die präparative Elektrophorese als Reinigungsmethode angewandet. Als Vorversuche wurden Markerproteine und die Aktivitäten B1 und C mittels PAGE nach Davis elektrophoretisch aufgetrennt, um die Trenneigenschaften der PAGE gegenüber Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und verschiedenen isoelektrischen Punkten (IP) zu prüfen. In Tabelle 8 sind die Molekulargewichte und IP der Markerproteine und deren R_F-Werte nach PAGE dargestellt.

Demnach werden die resultierenden R_F-Werte größer, je niedriger der IP oder je kleiner das Molekulargewicht eines Proteins ist. Um gutes Trennverhalten zu erreichen, sollten die aufzutragenden Proben frei von Ionen sein. Das Auftreten von mehreren Banden ist durch Assoziation der Proteine zu Di-, Tri- oder Tetrameren (Albumin) oder Dissoziation der Proteine in ihre Untereinheiten (Galactosidase, Hämoglobin) zu erklären.

Entsprechend der Elutionsbedingungen der Ionenaustauschchromatographie und der R_F-Werte der Hauptbanden (PAGE) der Abbauaktivitäten B1 und C (Abbildung 36), liegen deren isoelektrischen Punkte im Bereich von 4,5 bis 6,8.

PAGE nach Davis der Insulinabbauaktivitäten B1 und C nach Gelfiltration an Sephacryl S300.

4 - 16 % Acrylamid-Gradientengel (nach 4.6.1.)

Es wurden 30 µg Protein je Aktivität aufgetragen.
A = Insulinabbauaktivität B1
B = Insulinabbauaktivität C

Abbildung 36:

Protein	Untereinheit	MG	IP	R_F-Wert
Ovalbumin	1 x 45 000	45 000	4,6	0,66 - 0,6
Albumin	1 x 68 000	68 000	4,9	0,59/0,47/0,39
Thyroglobulin	2 x 335 000	669 000	4,5	0,21
ß-Galactosidase	4 x 135 000	540 000	4,6	0,6/0,48/0,40/0,37
ADH	4 x 35 000	148 000	5,4	0,47 - 0,43
Leucin-Aminopeptidase (Catepsin D)	1 x 42 000	42 000	6,6	0,37
Phosphorylase b	1 x 92 000	92 000	5,6	0,35
Katalase	4 x 60 000	240 000	5,8	0,39 - 0,32
Aldolase	4 x 42 000	158 000	6,1	0,14
Hämoglobin	4 x 16 000	64 000	6,7	0,47/0,45/0,42/0,38
ß-Chymotrypsin	2 x 21 500	43 000	8,6	-
Trypsin	1 x 23 500	23 500	10,8	-
Chymotrypsinogen A	4 x 25 000	105 000	8,6	-

Tabelle 8: PAGE nach Davis von Proteinen mit unterschiedlichem Molekulargewicht und verschiedenen isoelektrischen Punkten.
4 - 14 % Acrylamid-Gradientengele (nach 4.6.1.).
Es wurden 5 µg je Protein aufgetragen. Die Proteine ohne R_F-Wert-Angabe laufen nicht in das Trenngel hinein.

Beide Insulinabbauaktivitäten besitzen größenordnungsmäßig ein Molekulargewicht von 55 000 - 70 000 und die R_F-Werte der Proteinbanden nach PAGE entsprechen vergleichsweise den Markerproteinen Albumin (MG 68 000) oder Hämoglobin (MG 64 000). Zuordnungen der Banden nach PAGE zu Banden

der SDS-PAGE sind problematisch. Der Vergleich der Intensitäten der Blaufärbung von Banden könnte als einziges Merkmal dienen, war aber nicht eindeutig. Für die analytische PAGE der Aktivitäten B1 und C wurde ein 4 - 16 % Acrylamid Gradientengel verwendet. Um eine höhere Mobilität der Proteine zu erreichen, wurden für die präparative Elektrophorese 5 oder 7 % Acrylamid-Gele (homogen) verwendet.

Wie aus Tabelle 9 zu ersehen ist, eluiert für Insulinabbauaktivität B1 an zwei Positionen Abbauaktivität. Von Abbauaktivität C wurde nur an einer Position Abbauaktivität eluiert. Es wurden für die Abbauaktivität C zwei verschiedene Trenngel-Konzentrationen verwendet, da die Abbauaktivität bei 5 % Trenngel-Konzentration mit dem Bromphenolblau eluiert wurde. Auch nach Verwendung eines 7 % Trenngels wurde nur ein Aktivitätspeak eluiert.

Die hier erhaltenen Aktivitäten wurden getrennt vereinigt, von jedem Pool 1 ml entnommen, dialysiert, lyophilisiert und mittels SDS-PAGE auf ihre Bandenmuster untersucht. Abbildung 37 zeigt die Zuordnung der Insulinabbauaktivitäten nach präparativer PAGE, zu den Banden der SDS-PAGE nach Ionenaustauschchromatographie. Demnach eluiert von Insulinabbauaktivität B1 als erstes ein Protein von der PAGE, das auf der SDS-PAGE im nicht reduzierten Zustand Bande 4 (MG 56 000) und im reduzierten Zustand der Bande 6 (MG 68 000) entspricht. Als zweite Aktivität eluiert ein Protein, welches ebenfalls Bande 4 entspricht und ein MG von 56 000 besitzt. Dieses Protein verhält sich reduziert sowie nicht reduziert nach SDS-PAGE gleich.

Mittels der Affinitätschromatographie konnte ebenfalls das erstgenannte Protein (Bande 6/4, red./nichtred.) gereinigt werden, besaß jedoch nach Affinitätschromatographie keine Insulinabbauaktivität mehr. Der Grund hierfür könnten die Reduktionsbedingungen sein, da bei der Affinitätschromato-

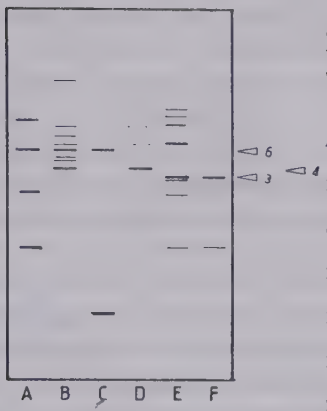


Abbildung 37:

SDS-PAGE der Insulinabbauaktivität B1 und C nach präparativer PAGE. Alle Proben wurden reduziert aufgetragen.

4 - 14 % Acrylamid-Gradientengel (nach 4.6.1.)

A = Standardproteine, vgl. Abb. 19 B, Probe 1/15
B = Insulinabbauaktivität B1, vgl. Abb. 20, Probe 1 - 4 B1
C = Insulinabbauaktivität B1A nach präparativer PAGE, 5 µg Protein aufgetragen
D = Insulinabbauaktivität B1B nach präparativer PAGE, 5 µg Protein aufgetragen
E = Insulinabbauaktivität C, vgl. Abb. 20, Probe 1 - 4 C
F = Insulinabbauaktivität C, Eluat nach präparativer PAGE, 5 µg Protein aufgetragen

Die mit Pfeil markierten Banden 3, 4 und 6 entsprechen denen aus Abbildung 20.

Präparative PAGE	Abbauaktivität	Trenngelkonz. (%)	Elutionsbereich Fraktions-Nr.	125J-A14-Insulinabbau % TCA-Löslichkeit + GSH	+ GSH/n.I.	Abbau % (RIA) + GSH
1	B1	5	9 - 14	-	-	80-90
			67 - 77	-	-	80-90
2	B1	5	10 - 16	-	-	80-90
			70 - 79	-	-	80-90
3	C	5	2 - 7	8,0	7,5	95
4	C	7	26 - 35	2,5	4,5	92

Tabelle 9: Präparative PAGE der Insulinabbauaktivitäten B1 und C. Probenvorbereitung und Elektrophoresebedingungen vergleiche 4.6.2..

50 000 cpm 125J-A14-Insulin Schwein, in 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4% 0,03 % Triton (Tris/HCl)
\+ 50 µl Fraktion (in Elektrodenpuffer)
+/- 10 µl nat. Insulin, 1 mg/ml
\+ 10 µl GSH, 10 mM
\+ Tris/HCl ad 250 µl

Die Proben wurden 1 h bei + 30° C inkubiert und entsprechend 4.7.1/2. aufgearbeitet. Die eingesetzten Proben der Fraktionen wurden auf pH 7,4 eingestellt (0,1 n HCl). Für die Elektrophoresen 1,2 und 3,4 wurden Insulinabbauaktivitäten von zwei unterschiedlichen Lebermikrosomen-Präparationen verwendet.

graphie die Proteine in reduziertem Zustand (vgl. 4.11.) aufgetragen wurden. Die Insulinabbauaktivität könnte durch die Reduktion inaktiviert werden. Nach der Elution wird demnach nur ein Teil reoxidierte aktive Form vorgefunden.

Die Insulinabbauaktivität C ist auch nach präparativer Elektrophorese einheitlich,und entspricht der Bande drei (MG 53 000) nach SDS-PAGE. Reduziert sowie nicht reduziert verhält sich die Aktivität C gleich.

Die in Kapitel 5.8 und 5.9. gezeigten Versuche zur weiteren Reinigung der Insulinabbauaktivitäten B1 und C favorisieren die präparative PAGE nach Davis als weitere Reinigungsmethode. Die präparative PAGE scheint keine Inaktivierung der Abbauaktivitäten zu bewirken und weiterhin erhält man relativ saubere Proteine, die nur noch geringe Verunreinigungen (im gleichen MG-Bereich, vgl. Abb. 37) aufweisen.

Im Folgenden wird die, für Aktivität B1, nach präparativer PAGE zuerst eluierte Aktivität als B1A bezeichnet. (Bande 6/4, red./nichtred.). Die zweite Aktivität die eluiert wurde wird mit B2B bezeichnet (Bande 4, red./nichtred.).
B1A entspricht Eluat 2 nach Affinitätschromatographie,
B1B entspricht Eluat 1 nach Affinitätschromatographie.

6. DISKUSSION

6.1. Insulinabbau

Die Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor in der Zellmembran von Zielgeweben und die Internalisierung des Insulin-Rezeptorkomplex kann nach dem heutigen Stand der Forschung als gegeben angesehen werden. Das Schicksal des Insulins innerhalb der Zelle sowie die Mechanismen der zellulären Insulinwirkungen sind bis heute noch unklar. Zur Wirkung von Insulin und zum Insulinabbau werden unter anderem zwei Theorien in Erwägung gezogen. Einerseits soll der Insulinabbau zur Terminierung der Insulinwirkung dienen, andererseits wird die Möglichkeit der Insulinwirkung durch Insulinabbauprodukte diskutiert.

Der Insulinabbau wurde bisher an den Geweben Leber, Fett, Niere und Muskel sowie deren Zellen oder Zellkulturen untersucht. Es sind verschiedene Enzyme beschrieben, die am Insulinabbau beteiligt sind. Einige Enzyme wurden bereits isoliert. Es handelt sich dabei um proteolytische Abbauenzyme, die membrangebunden sowie cytosolisch vorkommen und weiterhin die Proteindisulfid-Oxidoreduktasen, die Disulfidbrücken spalten und mikrosomal vorliegen. Außerdem wurden lysosomale Abbauvorgänge beschrieben. Welches der Enzyme den Insulinabbau einleitet, ist noch unklar. Einige Autoren schreiben jeweils den Primärschritt des Insulinabbaus den von ihnen gereinigten Enzymen zu, schließen aber eine sekundäre Beteiligung anderer nachgewiesener Insulinabbauaktivitäten nicht aus. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden die proteolytischen oder reduktiv spaltenden Enzyme untersucht. Die physikalischen Größen wie Molekulargewicht (MG), Isoelektrischer-Punkt (IP) und K_M-Werte gleicher Enzyme differieren stark (49, 51, 166). Dies kann einerseits auf die Isolierungsmethoden, aber auch auf die angewandten Nach-

weismethoden zurückzuführen sein.

In dieser Arbeit wurden Lebermikrosomen auf das Vorhandensein von Insulinabbauaktivität untersucht. Es sollte die Frage geklärt werden, ob Lebermikrosomen nur eine oder verschiedene Insulinabbauaktivitäten enthalten,um eine spätere Klärung der Verteilung der Aktivitäten auf bestimmte Membranstrukturen und deren Beteiligung an Insulinabbauvorgängen zu ermöglichen. Hierzu wurden Lebermikrosomen isoliert und deren Proteine mittels Triton X-100, einem nichtionischen Detergenz, aus den Membranen extrahiert. Frühere Untersuchungen (106, 127) von Lebermikrosomen (LM) und deren Tritonextrakten (LME), mittels unterschiedlicher aus der Literatur bekannten Inhibitoren und Aktivatoren des Insulinabbaus, wiesen auf das Vorhandensein differenter Insulinabbauaktivitäten hin. Versuche der Trennung der Abbauaktivitäten auf Grund ihrer Molekülgröße waren nicht möglich (127). Hierbei erwies sich außerdem das Detergenz Triton X-100 als störend. Es wurde daher durch Chromatographie an Servachrom XAD-2 entfernt. Das hier erhaltene Eluat wurde vom unlöslichen Protein durch Zentrifugation befreit und am Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A50 mittels Stufengradient aufgetrennt. Es wurden die vier Abbauaktivitäten A, B1, B2 und C erhalten.

Zur Untersuchung des Insulinabbaus wurden unterschiedliche Abbaubedingungen ($\pm$ GSH, $\pm$ natives Insulin, $\pm$ Ionen) angewandt. Es wurden lange Inkubationszeiten gewählt, um einen möglichst vollständigen Insulinabbau zu gewährleisten. Frühere Untersuchungen zur Zeit- und Temperaturabhängigkeit (127) haben gezeigt, daß nach Inkubation von LM oder LME mit 125J-Insulin nach 1 h bei + 30° C das 125J-Insulin vollständig abgebaut ist. Als Testmethoden für den Insulinabbau wurden die TCA-Fällung, der Radioimmunoassay, die Gelchromatographie an Sephadex G50 fine und die PAGE nach Davis angewandt. Die verschiedenen Inkubationsbedingungen und die unterschiedliche Aussagekraft der Testmethoden, er-

möglichte differenzierte Aussagen über die Insulinabbauaktivitäten.

6.2. Eigenschaften von LM, LME und XADEÜ

Die in Kapitel 5.3. und 5.7.3. dargestellten Ergebnisse zur Untersuchung der Insulinabbauaktivität an Lebermikrosomen (LM), Lebermikrosomenextrakte (LME) und XAD-Eluat-Überständen (XADEÜ) sind der Beweis für das Vorhandensein verschiedener Insulinabbauaktivitäten. Die Kombination der Gelchromatographie der 125J-Insulin-Abbauprodukte und deren PAGE nach Davis lassen Aussagen über den Mechanismus des Insulinabbaus zu. Durch die Unterscheidung von proteolytisch und reduktiv entstehenden Abbauprodukten mittels PAGE (Tab. 4) konnte eindeutig gezeigt werden, daß LM, LME und XADEÜ sowohl proteolytisch als auch reduktiv spaltende Insulinabbauaktivitäten enthält. Der LME und XADEÜ zeigen keine Veränderung der Abbaueigenschaften gegenüber LM. Demnach sind die membrangebundenen Insulinabbauaktivitäten wasserlöslich und gut aus den LM isolierbar. Aus diesem Grund wurden keine anderen Verfahren zur Solubilisierung von Membranproteinen durchgeführt.

Ein gravierender Unterschied im Abbauverhalten zeigt sich bei Inkubation mit und ohne nativem Insulin im Ansatz. Sobald Insulin ($\pm$ GSH) im Ansatz vorhanden war (10 µg/Ansatz = 7 µM), wurden keine proteolytischen Insulinbruchstücke mit Molekulargewicht kleiner 2000 erhalten. Demnach entstehen mit nativem Insulin im Ansatz (Abb. 12 - 14) nur Abbauprodukte mit Molekulargewicht größer 2000, die sowohl proteolytischer als auch reduktiver Herkunft sein können. Bei der Klärung dieses Phänomens spielen die K_M-Werte, maximalen Geschwindigkeiten (V_{max}) und Mengenverhältnisse der vorliegenden Aktivitäten eine Rolle. Die in der Literatur beschriebenen proteolytischen Enzyme besitzen niedrige K_M-Werte und niedrige V_{max}, während die Proteindisulfid-Oxido-

reduktasen (Glutathion-Insulin-Transhydrogenase = GIT) mit hohem K_M-Wert und hohem V_{max} beschrieben sind. Bei niedriger Insulinkonzentration, im Bereich der K_M-Werte (10^{-7} M) der proteolytischen Abbauaktivitäten, baut diese bevorzugt Insulin ab. Bei hohen Insulinkonzentrationen, im Bereich des K_M-Wert der GIT (10^{-5} M), baut diese bevorzugt Insulin ab. Unter der Annahme, gleicher Proteinkonzentration der verschiedenen Abbauaktivitäten und der Differenz der V_{max} um das 10^3-fach zu Gunsten der reduktiv spaltenden Aktivität, sowie eine Insulinkonzentration von 10^{-5} M, ist zu Beginn der Abbaureaktion die Geschwindigkeit der reduktiv spaltenden Aktivität 500-fach erhöht. Es können für diesen Fall nur wenig niedermolekulare Bruchstücke entstehen. Die Verschiebung der Mengenverhältnisse der Abbauaktivitäten zueinander wirken sich auf die Umsatzrate von Insulin ebenfalls aus. Die 10-fache Menge an reduktiv spaltender Aktivität und eine 100-fach höhere V_{max} ergibt ebenfalls eine 500-fache Abbaugeschwindigkeit dieser Aktivität zu Beginn der Inkubation. Da in diesem Fall die reduktive Spaltung bevorzugt ist, ergibt sich zusätzlich die Frage der Spezifität der proteolytischen Aktivität gegenüber der entstehenden A- und B-Kette. Das Abbauverhalten dieser Produkte gegenüber den hier vorliegenden Aktivitäten wurde nicht geprüft und ist nur schwer abzuschätzen. Für den Fall der Insulinkonzentration im Bereich des K_M-Wertes (oder niedriger) der proteolytischen Aktivität ist dieser Abbauweg primär. Der reduktive Abbauweg ist unter diesen Bedingungen gering. Wie aus Abbildung 12-14 zu ersehen ist, entstehen bei dieser Bedingung ($\pm$ GSH) 125J-Insulinbruchstücke, die im J-Tyrosin-Peak auftreten. Dabei handelt es sich um Di- oder Tripeptide mit 125J-Tyrosin oder 125J-Tyrosin selbst. Das Insulin wird demnach an verschiedenen Stellen gespalten und vollständig zu kleinen Bruchstücken abgebaut. Aus der Literatur ist bekannt, daß die Insulin-spezifischen Proteasen das Insulin an verschiedenen Stellen spalten können. Das muß für die hier vorliegenden proteolytischen Aktivitäten ebenfalls zutreffen. Auch für den Fall, daß die maximale Geschwindig-

keit der reduktiven gegenüber der proteolytischen Aktivität (bei gleicher Proteinkonzentration) nur 10-fach erhöht ist, und die Insulinkonzentration 10^{-5} M beträgt, ist der reduktive Abbauweg bevorzugt, der proteolytische Abbau geht allerdings ebenfalls vor sich. Da hier das Insulinangebot für die Protease sehr hoch ist, wird Insulin wahrscheinlich nur an einer Stelle proteolytisch gespalten und es können ebenfalls keine kleinen Insulinbruchstücke auftreten. Auch hier bleibt die Frage der Reaktivität gegenüber der A- und B-Kette offen. An Hand der Bandenmuster nach PAGE (Tab. 4) konnte nachgewiesen werden, daß mit nat. Insulin und GSH im Inkubationsansatz hauptsächlich reduktive Abbauprodukte durch LM, LME und XADEÜ gebildet werden. Wahrscheinlich spielen alle oben genannten Faktoren beim Abbau in Insulin durch LM, LME und XADEÜ eine Rolle.

Weiterhin ist zu sehen, daß die Gesamtabbauaktivität der Lebermikrosomen GSH-abhängig ist, da mit fortschreitender Aufarbeitung eine Abnahme des gesamten Insulinabbaus ersichtlich ist, die durch Zugabe von GSH aufgehoben ist. Mit GSH im Ansatz zeigte sich gleiches Abbauverhalten, allerdings gesteigerte Abbauaktivität. Dies ist hauptsächlich am XADEÜ (Abb. 14) feststellbar, der mit nat. Insulin im Ansatz fast keinen Insulinabbau mehr aufweist und mit nat. Insulin und GSH im Ansatz das gleiche Elutionsprofil besitzt wie LM oder LME (Abb. 12 - 14) unter gleichen Inkubationsbedingungen. Auch die Bandenmuster (R_F-Werte) nach PAGE gleichen sich unter diesen Bedingungen (Tab. 4).

Die geringe TCA-Löslichkeit und hohe Immunreaktivität der XADEÜe (Tab. 2) ist nur schwer interpretierbar. Ursache ist wahrscheinlich der Gesamtverlust an Abbauaktivität durch den zusätzlichen Präparationsschritt (Entfernung des Detergenz). Zum Abbautest von LM, LME und XADEÜ wurden Verdünnungen eingesetzt, die einem LME von 0,1 % an Triton entsprechen. Die Inkubationsansätze sollten also gleiche Konzentrationen an

Abbauaktivität besitzen, falls keine Abbauaktivität verloren geht. Der Verlust nur einer Abbauaktivität im XADEÜ ist unwahrscheinlich, da wie oben erwähnt, gleiche Elutionsprofile und Bandenmuster nach PAGE erhalten wurden wie mit LM.

Gegenüber Lagerung bei -30° C scheint die Insulinabbauaktivität aus LM sowie LME unempfindlich zu sein. Während der Lagerung werden wahrscheinlich freie SH-Funktionen oxidiert (Abb. 10, 11). Nach Lagerung der LM und LME bei - 30° C und anschließendem Austesten (mit nat. Insulin im Ansatz) ist kein Insulinabbau mehr vorhanden, während mit GSH im Ansatz gleiche Elutionsprofile und Bandenmuster wie vor Lagerung erhalten werden (Abb 10, 11). Auch dieses Ergebnis zeigt nochmals die GSH-abhängigkeit der Insulinabbauaktivität.

6.3. Abbauaktivität A

Nach Ionenaustauschchromatographie wurden vier Insulinabbauaktivitäten erhalten (5.2., Abb. 6). Eine Aktivität wurde nicht an den Austauscher gebunden und eluierte im Durchlauf. Sie wurde mit Aktivität A bezeichnet. Die Aktivität A war nur im pH-Bereich von 4 - 5 aktiv, trat allerdings nicht bei allen Leberpräparationen auf. Sie ist nicht GSH-aktivierbar und zeigt keine Abhängigkeit gegenüber den hier verwendeten zweiwertigen Ionen (Ca, Mg, Mn, Zn, Cu, Abb. 7). Nur Bacitracin zeigte in hoher Konzentration (3mM, Abb. 8) inhibierende Wirkung, was wahrscheinlich auf dessen Peptidstruktur zurückzuführen ist. Das Molekulargewicht von 37 000 (Abb. 22) und die oben aufgeführten Bedingungen sind Indizien für ein lysosomales Enzym. Nach Ionenaustauschchromatographie der Aktivität A an SP-Sephadex C25 und Gelchromatographie an Sephacryl S300 konnte keine anfärbbare Proteinbande auf der SDS-PAGE nachgewiesen werden. Dies und das Fehlen der Aktivität A in einigen Lebermikrosomenpräpara-

tionen sind Hinweise auf eine geringe Verunreinigung von Mikrosomen mit lysosomalen Bestandteilen. Nach Deger (40), liegen in den hier verwendeten Mikrosomenpräparationen nur geringe Anteile an lysosomalen Bestandteilen vor. Aus diesen Gründen wurde die Aktivität A nicht weiter untersucht.

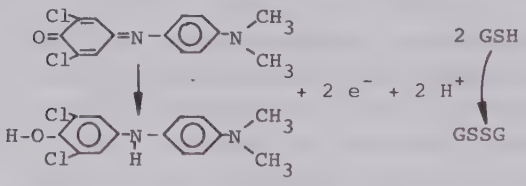
Das in der Literatur beschriebene Enzym Cathepsin D (9) besitzt je nach Aufarbeitungsmethode und Quelle ein Molekulargewicht von 42 000, ein pH-Optimum von 2,8 - 5, einen IP von 5,5 - 5,6 und stellt eine Endopeptidase dar, welche bevorzugt in Phe-Phe-Position spaltet. Catepsin D ist nicht ionenabhängig und zeigt keine Abhängigkeit gegenüber GSH.

An Hand der oben aufgezählten Eigenschaften der Aktivität A und von Cathepsin D könnte es sich um das gleiche Protein handeln. Alle anderen lysosomalen proteolytischen Aktivitäten besitzen weniger übereinstimmende Merkmale und wurden deshalb nicht in Erwägung gezogen. Eine Übereinstimmung der von Duckworth oder Grisolia (47, 75) gefundenen lysosomalen Proteinase liegt nicht vor, da diese durch SH-Blocker hemmbar sein soll.

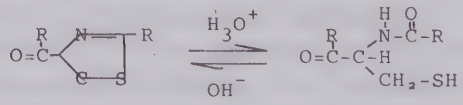
6.4. Abbauaktivität B1

Mit 0,1 M NaCl wurde vom Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A50 die Abbauaktivität B1 eluiert (Abb. 6). Gegenüber den zweiwertigen Ionen Ca, Mg, Mn und Komplexbildnern wie EDTA oder o-Phenanthrolin zeigt die Aktivität B1 keine Abhängigkeit. Das trifft auch für Aktivität B2 und C zu. LM und LME zeigen eine solche Abhängigkeit. Das kann nur durch eine unspezifische Protease erklärt werden, die A-, B-Kette oder andere Insulinbruchstücke umsetzt und ionenabhängig ist. Diese muß durch die Ionenaustauschchromatographie abgetrennt werden und ist durch Austesten mit intaktem Insulin nicht nachweisbar. Cu, Zn, NEM, Jodacetamid und Dichlorphenol-Indophenol

wirken hingegen als gute Inhibitoren, während mit Bacitracin keine 100 %ige Hemmung mehr erreicht wird (Abb. 7 und 8). Jodacetamid und NEM sind als SH-Blocker bekannt. Cu und Zn können ebenfalls mit SH-Funktionen reagieren und bilden deren Sulfide. Dichlorphenol-Indophenol dient als Oxidationsmittel für Flavinnucleotide in der Atmungskette. Die hemmende Wirkung gegenüber Aktivität B1 kann demnach auf die oxidierende Wirkung von Dichlorphenol-Indophenol zurückzuführen sein. Während GSH als Reduktionsmittel Dithiole im Protein zu SH-Funktionen aktivieren kann, ist der umgekehrte Fall für Dichlorphenol-Indophenol (DCPIP) möglich, nämlich die Oxidation von SH-Funktionen zu Dithiolen.



Die inhibierende Wirkung von Bacitracin ist unklar. Bacitracin ist ein Peptid aus 11 Aminosäuren. 6 Aminosäuren bilden ein Ringsystem und die restlichen 5 Aminosäuren bilden eine Seitenkette mit einem Thiazolin-Ring aus Cystein und Isoleucin. Die hemmende Wirkung kann auf der Peptidstruktur oder auf der Wechselwirkung mit dem Thiazolin-Ring in einer der beiden gezeigten Formen beruhen.



Die weitere Reinigung der Aktivität B1 über präparative PAGE (5.9.) hat gezeigt, daß es sich nicht um eine einheitliche Abbauaktivität handelt. Aus Aktivität B1 konnten zwei Proteine mit Abbauaktivität (B1A und B1B) isoliert werden. Die Aktivität B1A besitzt nach SDS-PAGE (Abb. 37) ein MG von 68 000 im reduzierten und von 56 000 im nicht reduzierten Zustand. Die Aktivität B1B besitzt im reduzierten wie

nicht reduzierten Zustand ein MG von 56 000. Durch Reduktion mit Dithioerythrit muß die Aktivität B1A eine andere räumliche Struktur annehmen, was durch die Spaltung von Disulfidbrücken erzielt wird. In reduziertem Zustand ist die Aktivität B1A auch über Affinitätschromatographie an Mercaptopyridin-aktivierter-GSH-Sepharose 4B von Aktivität B1B (in 5.8. beschrieben) zu trennen. Die Abbaueigenschaft von B1A geht hier allerdings fast vollständig verloren. Da die Proteine hier in reduzierter Form aufgetragen werden, kann dies die Zerstörung der Struktur des nativen Zustands bedeuten. Durch die anschließende Reoxidation durch Luftsauerstoff wird wahrscheinlich nicht mehr die vollständig aktive Form der Abbauaktivität erhalten. Ob Aktivität B1B ebenfalls reduzierbare Disulfidbrücken besitzt geht aus diesen Experimenten nicht schlüssig hervor, da eine Reduktion von Disulfidbrücken nicht unbedingt eine Konformationsänderung bedingt.

Die Ergebnisse der Photoaffinitätsmarkierung der Insulinabbauaktivität B1 (in 5.6.) sind mit der Information, daß es sich hier um zwei unterschiedliche Aktivitäten (B1A und B1B) handelt, einfacher zu interpretieren. Die Molekulargewichtsdifferenzen von den radioaktiven Banden zu den Proteinbanden nach SDS-PAGE (Abb. 26, Probe 2+3) wurden mit einer Vergrößerung des Proteins durch gebundenes 125J-MABI erklärt. Die Radioaktivitätsbande mit dem höchsten MG in Probe 3 könnte Aktivität B1A (wegen deren Reduktionsverhalten) zugeordnet werden. Es wäre denkbar, daß durch Wechselwirkung von Aktivität B1A mit Insulin über einen SH-Austausch eine Konformationsänderung vor sich geht, die eine MG-Differenz von 12 000 zur Proteinbande in Probe 2 ausmacht. Die radioaktive Bande mit dem nächstniedrigeren MG kann dann der Aktivität B1B zugeordnet werden. Durch die Bindung von 125J-MABI an die Aktivität B1B entsteht hier die MG-Differenz von 6000 von Protein- zu Radioaktivitätsbande.

Die Aktivitäten B1A und B1B wurden bisher nicht auf ihre Insulinabbauprodukte untersucht. Es wurden nur die durch Aktivität B1 gebildeten 125J-Insulinabbauprodukte mittels Gelfiltration und PAGE aufgetrennt. B1 zeigt im Vergleich zu LM, LME und XADEÜ ein anderes Bandenmuster der Abbauprodukte aus den Peaks der Gelfiltration (Abb. 12 - 15, Tab. 4 und 5). Mit und ohne GSH im Inkubationsansatz waren hauptsächlich Banden vorhanden, die proteolytisch entstehen müssen. Die typischen Peaks und Banden von reduktiven Spaltprodukten fehlen. Nach Abbau mit nat. Insulin im Ansatz ist nach Gelfiltration nur der Insulinpeak vorhanden, der nach PAGE zwei Banden aufweist. Eine davon stellt 125J-Insulin dar. Mit nat. Insulin und GSH im Ansatz fehlen ebenfalls die typischen Peaks und Banden von reduktiven Spaltprodukten. Es entstehen fast keine niedermolekularen Produkte. Dies bestätigt die für LM, LME und XADEÜ gemachten Aussagen über K_M-Wert (Insulinkonzentration), V_{max} und die Enzymmenge, die einen Einfluß auf die Bildung von niedermolekularen Abbauprodukte haben. B1 stellt somit eindeutig proteolytische Abbauaktivität dar. Da sich Aktivität B1 aus zwei unterschiedlichen Aktivitäten (B1A und B1B) zusammensetzt, ist durch das Zusammenwirken dieser Aktivitäten die Entstehung einer Reihe unterschiedlicher Bruchstücke ermöglicht. Das Auftreten niedermolekularer Bruchstücke ist dadurch ebenfalls einfacher erklärbar, da die zwei Aktivitäten höchstwahrscheinlich andere Spaltstellen am Insulin besitzen. Durch GSH ist der Abbau erhöht. Es ist möglich, daß nur eine der Aktivitäten GSH-aktivierbar ist. Das veränderte Abbauverhalten gegenüber LM, LME und XADEÜ ist durch das Fehlen der reduktiv spaltenden Aktivität C erklärbar, da das Zusammenwirken aller Abbauaktivitäten andere Bruchstücke ermöglicht.

Duckworth (149) beschreibt eine spezifische membrangebundene Protease (NEM-hemmbar), die Insulin in Position B 16/17 spaltet und dadurch den Angriff einer weiteren unspezifi-

schen Endopeptidase ermöglicht, wodurch eine Reihe unterschiedlicher Bruchstücke entstehen. Die Endopeptidase soll allerdings intaktes Insulin nicht angreifen und ist nicht NEM-hemmbar. Brush (19) beschreibt eine spezifische cytosolische Protease, die mehrere Spaltstellen für Insulin besitzt und ebenfalls eine Reihe von Bruchstücken ermöglicht. Die Protease besitzt ein MG von 71 000,ist NEM-hemmbar und soll nicht der von Duckworth (149) beschriebenen Protease entsprechen.

In dem hier vorliegenden Fall spalten beide Aktivitäten (B1A und B1B) Insulin (Tab. 9). Eine Kontamination von cytosolischer Protease ist nicht auszuschließen. Da allerdings die Aktivitäten B1B und B1A während der gesamten Anreicherung nach SDS-PAGE anfärbbare Banden mit gleicher Intensität aufweisen, kann es sich kaum um eine cytosolische Kontamination handeln. Eine Zuordnung der hier vorliegenden Abbauaktivitäten zu einer der in der Literatur beschriebenen Proteasen ist bisher nicht möglich.

6.5. Abbauaktivität B2

Die Aktivität B2 wurde mit 0,18 M NaCl vom Anionenaustauscher eluiert (Abb. 6). Vom Insulinabbauverhalten gegenüber Inhibitoren und Aktivatoren verhält sie sich wie Aktivität B1. Die Gelfiltrationen der Insulinabbaubruchstücke sowie deren Bandenmuster nach PAGE zeigen mit und ohne natives Insulin das Abbauverhalten entsprechend der Aktivität B1. Mit GSH, mit und ohne nativem Insulin im Ansatz,verhält sie sich wie LME oder XADEÜ (Abb. 13 - 16, Tab. 4 und 5). Dieses Ergebnis zeigt einerseits den Verlust von SH-Funktionen mit steigender Aufarbeitung, da mit GSH im Ansatz eine Reaktivierung der GSH-abhängigen Abbauaktivitäten möglich ist und beweist andererseits, daß Aktivität B2 eine Mischung aus B1 und C darstellt. Hierfür wurde bereits in 5.2. folgende Hypothese aufgestellt:

Mit 0,1 M NaCl wurde nicht sämtliche Aktivität B1 eluiert, mit 0,18 M NaCl wurde die verbleibende Aktivität B1 und bereits ein Teil Aktivität C eluiert. Veränderungen der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Abbauaktivitäten während der Aufarbeitung, wie Desamidierung oder Decarboxilierung sowie proteolytische Spaltungen, ohne den Verlust der Abbauaktivität, können unterschiedliche Elutionseigenschaften bedingen, die zu solchem Verhalten führen. Elektrophoretisch waren teilweise Proteinbanden mit entsprechendem Molekulargewicht der drei Aktivitäten B1A, B1B und C in Proben von Aktivität B2 nachweisbar (Abb. 20). Es muß sich hier jedoch nicht unbedingt um die Banden dieser drei Aktivitäten handeln, da Proteine die zwar gleiches Molekulargewicht, aber einen anderen IP wie B1 oder C besitzen, mit anderen NaCl-Konzentrationen vom Austauscher verdrängt werden. Außerdem könnten kleine Differenzen von pH-Wert oder Ionenstärke während der Elution Verschiebungen von Proteinbandenmuster der jeweiligen Aktivität mit sich bringen, womit ebenfalls eine ungleichmäßige Verteilung der drei Aktivitäten Aktivitätspeak B2 verursacht werden kann.

Die Photoaffinitätsmarkierung der Aktivität B2 bestätigt auch dieses Ergebnis (Abb. 25), da hier entsprechend Aktivität B1 und C Banden auftreten. Es tritt hier im Molekulargewichtsbereich von 40 000 eine Bande (GSH-abhängig) besonders stark auf. Nach Chromatographie der Aktivität B2 an Sephacryl S300, konnte in diesem Molekulargewichtsbereich keine Abbauaktivität festgestellt werden. Es handelt sich möglicherweise um ein Bruchstück des Insulin-Rezeptors mit Bindungsaffinität. Nach Koch und Klotz (105, 107) treten für den Insulin-Rezeptor spezifisch markierte Banden mit einer Molekulargewichtsdifferenz von 40 000 auf. Es wurden auch markierte Banden in diesem Bereich nachgewiesen. Dieses Phänomen wird auf den proteolytischen Abbau des Insulin-Rezeptors zurückgeführt. Die GSH-Abhängigkeit ist allerdings nicht interpretierbar. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, daß es sich um Bruchstücke eines der Insulin abbauenden

Proteine handelt, welches Bindungseigenschaften besitzt allerdings die Abbaueigenschaften verloren hat.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde die Aktivität B2 nicht weiter untersucht. Mittels präparativer PAGE sollten die drei Aktivitäten B1A, B1B und C aus Aktivität B2 nachweisbar sein.

6.6. Abbauaktivität C

Die mit 0,3 M NaCl eluierbare Abbauaktivität (Abb. 6) wurde mit C bezeichnet. Entsprechend der Aktivität B1 ist die Aktivität C mittels Cu, Zn, NEM, Jodacetamid und Dichlorphenol-Indophenol hemmbar, was durch Bacitracin in gleicher Konzentration (3 mM) nicht mehr vollständig möglich ist (Abb. 7 u. 8). Die inhibierende Wirkung der einzelnen Substanzen wurde bereits bei Aktivität B1 beschrieben und ist auf Aktivität C übertragbar.

Die Reinigung der Aktivität C mittels Affinitätschromatographie war nicht möglich. Es wurde keine Aktivität an das Gelmaterial gebunden. Auch unterschiedliche Bedingungen beim Auftragen der Aktivität C auf das Säulenmaterial waren erfolglos. Es wurden verschiedene pH- und Reduktionsbedingungen (vgl. 5.8.) untersucht. Durch präparative PAGE konnte ein Protein mit MG 53 000 isoliert werden, welches nur mit GSH im Inkubationsansatz Insulin abbaut.

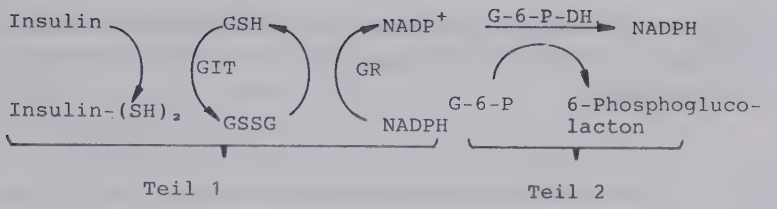
Die Untersuchung der Insulinabbauprodukte hat gezeigt, daß mit GSH, mit und ohne natives Insulin im Ansatz nur reduktive Abbauprodukte durch Aktivität C erhalten werden (Abb. 17, Tab. 5). Ohne GSH im Ansatz war keinerlei Insulinabbau feststellbar.

Die Photoaffinitätsmarkierung weist eine Radioaktivitätshauptbande mit MG 56 000 und eine weniger intensive Bande

mit MG 53 000 auf. Die anfärbbaren Proteinbanden besitzen Molekulargewichte von 50 000 und 53 000. Mit der Information das Aktivität C ein MG von 53 000 besitzt, stellt wahrscheinlich die Radioaktivitäts-Hauptbande das spezifisch markierte Protein dar. Es könnte sich bei dem kleineren Protein um proteolytisch veränderte Aktivität handeln, deren Bindungseigenschaften erhalten sind, während die Abbauaktivität verloren gegangen ist.

Das Molekulargewicht von 53 000, die GSH-Abhängigkeit, Hemmbarkeit durch SH-Blocker und die Bestätigung des Molekulargewichtes durch Photoaffinitätsmarkierung weisen auf die Glutathion-Insulin-Transhydrogenase (2, 160) hin.

Die Aktivität C baut bei den hier gewählten Inkubationsbedingungen auch physiologische Konzentrationen von Insulin ab. Das zeigen die Inkubationsbedingungen mit GSH, mit und ohne natives Insulin im Ansatz. Für beide Bedingungen wurden nach Gelfiltration und PAGE gleiche Peaks und Bandenmuster erhalten. In der Literatur wird der K_M-Wert für Glutathion-Insulin-Transhydrogenase mit 3 - 6 x 10^{-5} M angegeben. Der in der Literatur beschriebene photometrische Test (132) zur K_M-Wertbestimmung für GIT, ist sehr unempfindlich und eignet sich nicht für Messungen im niedermolaren Bereich von Insulin (nM). Auch die TCA-Fällung eignet sich nicht für kinetische Bestimmungen, da durch TCA auch teilweise Insulinbruchstücke ausgefällt werden, wodurch der Insulinabbau unterschätzt wird. Mit dem RIA sind Bestimmungen im niedermolaren Bereich von Insulin möglich, er ist aber für hohe Insulinkonzentrationen problematisch, da hier im unempfindlichen Bereich der RIA-Kurve gemessen wird. Vorversuche mittels des im folgenden beschriebenen gekoppelten Tests haben ebenfalls die Umsetzung physiologischer Mengen an Insulin durch Abbauaktivität C bestätigt.



Der oben aufgeführte Teil 1 entspricht dem bisher angewandten photometrischen Test. Der Teil 2 wurde angefügt, um auch geringen Umsatz an NADPH messen zu können. Zur Bestimmung von umgesetztem Insulin wird der Test (Teil 1) mit Säure gestoppt. Hierdurch wird das Enzym denaturiert und das nicht umgesetzte NADPH zersört. Durch anschließende Einstellung des pH-Wertes auf pH 8 - 8,4, konnte das $NADP^+$ mit Glucose-6-Phosphat (G-6-P) und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-P-DH) zu NADPH umgesetzt werden und fluorimetrisch bestimmt werden. GR entspricht der GSH-Oxidoreduktase. Das Testsystem birgt bisher noch einige Probleme und konnte noch nicht zur K_M-Wert-Bestimmung herangezogen werden. Die Bestimmung des K_M-Wertes und von V_{max} lassen erst eine eindeutige Aussage darüber zu, ob es sich bei Aktivität C um Glutathion-Insulin-Transhydrogenase handelt und ob diese Aktivität tatsächlich ein maßgebliches Enzym für den Insulinabbau darstellt. Das gleiche gilt für Aktivität B1A und B1B.

6.7. Abbauaktivität in Plasmamembranen

Die von Plasmamembranen (PM) und Lebermikrosomen gebildeten Insulinabbauprodukte wurden mittels Gelchromatographie und PAGE untersucht. Für beide Membranfraktionen wurden gleiche Elutionsprofile und Bandenmuster erhalten (vgl.Tab. 4 und 6). Der Gesamtabbau in Lebermikrosomen ist allerdings höher. Hieraus ist zu schließen, daß PM ebenfalls die drei Abbauaktivitäten B1A, B1B und C enthalten. Mikrosomale Verunreinigungen der Plasmamembranen sind allerdings nicht aus-

zuschließen (40). Genauere Aussagen hierzu sind über Nachweismethoden mittels Antikörper gegen die drei Abbauaktivitäten möglich.

6.8. Reinheit und Reaktivität von Insulin

Versuche zur Identifizierung von Insulinabbaubruchstücken haben verschiedene Probleme aufgezeigt. Ein wesentliches Erfordernis für Untersuchungen bei denen Insulin oder Insulinderivate eingesetzt werden, stellt ihre Reinheit dar. So kann ein unsauberes Ausgangsprodukt bei bestimmten Untersuchungsmethoden zu komplexen und unüberschaubaren Ergebnissen führen. Für die Gelchromatographie oder PAGE sind weitaus größere Anforderungen an die Ausgangssubstanzen zu stellen. Insulin besitzt 4 Tyrosine, wovon zwei in der A-Kette und zwei in der B-Kette enthalten sind.Je mehr unterschiedlich jodierte Tyrosine das Insulin enthält, desto schwieriger werden eindeutige Aussagen über die Entstehung der Insulinfragmente. Durch die Verwendung von Monokomponentem ^{125}J-(Tyr^{A14})Insulin kann die Frage der möglichen entstehenden Insulinfragmente auf die Beteiligung des 125J-Tyrosin in der Position A14 der A-Kette beschränkt werden. Zum Nachweis des Insulinabbaus durch LM oder LME mittels TCA-Fällung oder Radioimmunoassay spielt die Reinheit des verwendeten Ausgangsproduktes eine untergeordnete Rolle.

Zur Untersuchung der Reinheit von jodiertem Insulin und auch zur Reinigung selbst werden Elektrophorese- und HPLC-Trennungen durchgeführt (113-116, 168, 169). Die PAGE nach Davis wurde in dieser Arbeit zur Reinheitsprüfung und zur Untersuchung von Insulinabbaubruchstücken angewandt (5.7.). Sie erwies sich als gute ergänzende Methode zur Gelfiltration. Hiermit konnte gezeigt werden, daß die nach Gelfiltration erhaltenen Bruchstücke in den eluierten Peaks uneinheitlich waren. Auch im 125J-Insulin-Peak traten unterschiedliche Radioaktivitätsbanden nach PAGE auf (Tab. 4, 5).

Duckworth und andere Autoren (20, 49, 123) haben mit Wiederbindungsstudien (am Insulinrezeptor) nachgewiesen, daß die Produkte im 125J-Insulin-Peak keine vollständige Bindungsfähigkeit gegenüber dem Insulinrezeptor aufweisen. Auch die Immunreaktivität dieser Produkte ist verringert. Demnach müssen hier bereits veränderte Insuline vorliegen. Das Auftreten unterschiedlicher Radioaktivitätsbanden nach PAGE bestätigt diese Ergebnisse.

Durch Kombination von Gelchromatographie und PAGE waren die weiteren Aussagen möglich:
Auf Grund der gleichen Bandenmuster der Insulinabbaupeaks von LM, LME und XADEÜ geht keine der Abbauaktivitäten während der Aufarbeitung verloren.
Plasmamembranen besitzten gleiche Peaks und Bandenmuster wie Lebermikrosomen, was den Schluß nahelegt, daß in beiden Membranpräparationen gleiche Abbauaktivitäten vorhanden sind.
Es konnten eindeutig proteolytisch und reduktiv entstehende Banden nachgewiesen werden.
Bei B1 handelt es sich demnach um proteolytischen, bei Aktivität C um eine reduktiv spaltende Abbauaktivität. Für Aktivität B2 konnte nachgewiesen werden, daß es sich um eine Mischung dieser beiden Aktivitäten handelt.

Ein zusätzliches Problem, außer dem Reinheitskriterium von 125J-Insulin, stellt die Reaktivität von NEM mit Insulin dar. NEM kann mit SH-Funktionen, aber auch mit Amino-Funktionen reagieren (Abb. 30). Die Reaktionsgeschwindigkeiten sind jedoch unterschiedlich. Die SH-Funktionen reagieren innerhalb von Minuten quantitativ, während die Amino-Funktionen erst nach einer Stunde in größerem Ausmaß umgesetzt sind. NEM wurde zum Stoppen von Insulinabbauvorgängen verwendet. Es stellte sich erst bei der näheren Untersuchung der Insulinabbauprodukte heraus, daß NEM auch mit Amino-Funktionen reagiert. Daraufhin wurden weitere Abbauinhibitoren, unter anderem auch die SH-Blocker Jodacetamid und

p-Chlormercuribenzoat (p-CMB), auf ihre Reaktivität gegenüber Insulin geprüft. Nach Behandlung von Insulin mit Jodacetamid und p-CMB weisen diese nach PAGE keine Reaktionsprodukte von Insulin auf. Dichlorphenol-Indophenol (DCPIP), ein Oxidationsmittel für Flavinnucleotide, reagiert ebenfalls mit Insulin. Dies hängt mit der oxidierenden Wirkung zusammen. Welche Oxidationsprodukte anschließend vorliegen ist unklar. Für weitere Abbauuntersuchungen wäre es sinnvoll einen Insulinabbau-Inhibitor zu verwenden, der nicht mit Insulin reagiert.

Der Einsatz solcher Agenzien (NEM, DCPIP) bei Rezeptorstudien (36, 37, 93, 107) und Radioimmunoassays ist fragwürdig, da Reaktionen mit Substrat sowie Rezeptor oder Antikörper vor sich gehen und deren Bindungseigenschaften verändern können (Tab. 3). Clark und Jarett (36, 37, 93) belegen z. B. die kovalente Bindung von Insulin am Rezeptor durch Beteiligung von SH-Funktionen. NEM oder Cytocalasin B sollen die für die Insulinbindung notwendigen SH-Funktionen am Rezeptor blockieren und damit die Bindung negativ beeinflussen. Die Bindungsbeeinflussung könnte allerdings auch auf die Reaktion von NEM oder Cytocalasin B mit Amino-Funktionen am Rezeptor, Insulin oder beiden vor sich gehen. In Cytocalasin B tritt die Maleinsäure-Struktur auf, an die wie bei NEM eine nucleophile Addition von SH-Funktionen stattfinden kann.

Die Herstellung von Dansylinsulin wurde versucht, um den Insulinabbau unabhängig von einer radioaktiven Markierung untersuchen zu können. Auch eine Anfärbung von Insulin oder Insulinfragmenten auf Gelen ist erschwert, da die Produkte aus dem Gel diffundieren und mit Coomassie Blue schlecht anfärbbar sind. Mittels eines einheitlichen Dansylinsulins kann man die Abbauprodukte direkt nach Elektrophorese mittels UV-Licht durch den Fluoreszenzmarker sichtbar machen. Die Reinigung und der Nachweis der Position der Dansylierung am Insulin ist noch nicht abgeschlossen. Mit der vorhandenen Ausgangssubstanz (Abb. 27) wurde bisher von Abbauuntersuchungen abgesehen, da dieses Produkt 6 Dansylinsuline aufweist.

Die Verwendung unterschiedlicher dansylierter Insuline (Gly A1, Phe B1, Lys B29) oder jodierter Insuline (Tyr A14, Tyr A19, Tyr B16, Tyr B26), sind für die Klärung der Position der proteolytischen Insulin-Spaltung von Vorteil. Da die in der Literatur beschriebenen proteolytischen Enzyme Insulin bevorzugt in der B-Kette spalten, sind B-Ketten markierte Insuline zur Untersuchung des proteolytischen Insulinabbau besser geeignet. Bisher wurde nur Tyr A14 jodiertes Insulin verwendet und man kann die Abbauaprodukte der B-Kette nicht nachweisen. Wie die Chromatographie von jodiertem Insulin zeigt, treten hier Adsoptionseffekte am Gelmaterial auf. Der 125J-Tyrosin-Peak erscheint bei der Gelfiltration erst weit hinter dem Salzpeak. Dadurch verschieben sich die Elutionspositionen von nativen zu jodierten Produkten. Die Verwendung von jodiertem Tracer bei chromatographischen Verfahren, zur Bestimmung der Aminosäuren der Abbauprodukte, ist deshalb nicht besonders geeignet. Mit dansyliertem Insulin treten solche Probleme nicht auf. Weiterhin kann durch den Fluoreszenzmarker eine wesentlich geringere Menge (10 - 100-fach empfindlicher) an Insulin im Vergleich zu nativem Insulin nachgewiesen werden. Für diese Untersuchungen sind die dansylierten Insuline von Vorteil.

7. Z U S A M M E N F A S S U N G

Es wurde die Insulinabbauaktivität aus der mikrosomalen Fraktion von Rattenleber untersucht.

Zur Auftrennung der Insulinabbauaktivität wurden Lebermikrosomen (LM) mit Triton X-100 extrahiert und anschließend zur Triton-Entfernung an Servachrom XAD-2 chromatographiert. Die Insulinabbauaktivität erwies sich als wasserlöslich und wurde an dem Ionenaustauscher DEAE-Sephadex A50 mittels NaCl-Stufengradienten aufgetrennt. Es wurden vier Insulinabbauaktivitäten eluiert, die mit Aktivität A, B1, B2 und C bezeichnet wurden. Aktivität A wurde vom Austauscher nicht gebunden, die Aktivitäten B1, B2 und C wurden gebunden und in dieser Reihenfolge mit 0,1, 0,18 und 0,3 M NaCl in Elutionspuffer vom Gel eluiert.

Die Abbauaktivitäten wurden auf ihre Aktivierbarkeit und Inhibierbarkeit geprüft. Aktivität A ist weder GSH- noch Ionenabhängig (Ca^{++},Mg^{++},Mn^{++},Mg^{++},Cu^{++},Zn^{++}). Mit EDTA und o-Phenanthrolin sowie SH-Blockern war keine Hemmung möglich. Sie ist nur im sauren pH-Bereich (pH 4-5) aktiv. Die Aktivität B1 und B2 sind durch GSH aktivierbar, bauen aber auch in Abwesenheit von GSH Insulin ab. Sie sind durch SH-Blocker sowie Cu^{++} und Zn^{++} hemmbar. Gegenüber Ca^{++}, Mg^{++}, Mn^{++} und den genannten Komplexbildnern zeigen sie keine Abhängigkeit. Im Gegensatz zu B1 und B2 baut Aktivität C nur in Gegenwart von GSH Insulin ab. Gegenüber Aktivatoren und Inhibitoren verhält sie sich wie die Aktivitäten B1 und B2. Alle drei Aktivitäten (B1, B2 und C) bauen im pH-Bereich von pH 7,4 ab.

Mittels Gelfiltration an Sephacryl S300 und SDS-PAGE nach Laemmli wurde das Molekulargewicht (MG) der Abbauaktivitäten bestimmt. Für Aktivität A ergab sich nach Gelfiltration ein MG von 37 000, für Aktivität B1, B2 und C ein MG im Bereich

von 58 000 - 78 000. Nach SDS-PAGE konnten in diesem MG-Bereich jeweis mehrere Proteinbanden für die Aktivitäten B1 und C nachgewiesen werden. Bei Aktivität B2 traten Proteinhauptbanden der Aktivität B1, C und weitere Proteine auf. Für Aktivität A war im MG-Bereich von 40 000 keine Proteinbande anfärbbar.

Die mit N^{eB29}-Mono-(4-azidobenzoyl)Insulin photoaffinitätsmarkierten Aktivitäten B1, B2 und C wurden ebenfalls mittels SDS-PAGE untersucht. Die erwünschte eindeutige Zuordnung der Proteinbanden der Insulinabbauaktivitäten zu den auftretenden markierten Banden war jedoch nicht möglich. Für alle drei Aktivitäten (B1, B2 und C) traten stets mehrere Radioaktivitätsbanden im MG-Bereich von 50 000 - 70 000 auf. Für Aktivität B2 wurden Radioaktivitätsbanden gefunden, die denen der Aktivität B1 und C entsprechen. Allerdings traten auch zusätzliche Banden auf. Die Verwendung der markierten Abbauaktivitäten zur Erleichterung weiterer Reinigungsschritte war nicht möglich.

Zur Untersuchung von Umfang und Art des Insulinabbaus wurden die TCA-Fällung, der Radioimmunoassay, die Gelfiltration an Sephadex G50 fine und die PAGE nach Davis angewandt. Die Untersuchungen ergaben, daß B1 und A eine proteolytische Abbauaktivität darstellen, während die Aktivität C Insulin reduktiv spaltet. Bei Aktivität B2 handelt es sich um eine Mischung aus Aktivität B1 und C. Durch die Reaktion von NEM mit Amino-Funktionen von Insulin ergaben sich Probleme bei der Untersuchung von 125J-Insulinabbauprodukten. NEM wurde zum Stoppen des Insulinabbaus eingesetzt. Es dient als SH-Blocker reagierte allerdings auch mit Amino-Funktionen des Insulins. Durch die unterschiedliche Reaktionsgeschwindigkeit von NEM gegenüber SH- und Amino-Funktionen konnten die auftretenden Komplikationen bei Insulinabbauuntersuchungen gelöst werden.

Zur weiteren Reinigung wurde versucht, die Aktivität B1 und C mittels Affinitätschromatographie an Mercaptopyridin-aktivierter-GSH-Sepharose zu reinigen. Die Affinitätschromatographie

erwies sich jedoch als ungeeignet. Für Aktivität C wurde kein Protein, für Aktivität B1 ein Protein an das Säulenmaterial gebunden. Dieses besaß allerdings keine Abbauaktivität. Durch präparative PAGE konnte eine Reinigung erzielt werden. Für Aktivität B1 wurden zwei unterschiedliche Insulinabbauaktivitäten (B1A und B1B) isoliert. Für Aktivität C wurde nur ein Protein mit Insulinabbauaktivität isoliert.

Aufgrund dieser Ergebnisse liegen vier unterschiedliche Abbauaktivitäten vor. Bei Aktivität A handelt es sich vom Abbauverhalten her um eine lysosomale Verunreinigung der LM, wobei eine Ähnlichkeit zu Cathepsin D nachweisbar ist. Aktivität B1A und B1B stellen proteolytische Aktivitäten dar, die gleiche Aktivierbarkeit und Hemmbarkeit aufweisen. Aktivität B1A besitzt im reduzierten Zustand ein MG von 68 000 und im nichtreduzierten Zustand von 56 000. Aktivität B1B besitzt reduziert sowie nichtreduziert ein MG von 56 000. Eine Zuordnung zu einer der in der Literatur beschriebenen Proteasen ist bisher nicht möglich. Die vierte Abbauaktivität C spaltet Insulin reduktiv, besitzt ein MG von 53 000 und entspricht von ihrem Abbauverhalten her der Glutathion-Insulin-Transhydrogenase.

8. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. Anderson, A., Olsson, S., Tralve, H. (1980) Biochem. Pharmacol. 29, 1729-1736

2. Ansorge, S., Bohley, P., Kirschke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Hanson, H., (1973) Eur. J. Biochem. 32, 27-35

3. Ansorge, S., Bohley, P., Kirschke, H., Langner, J., Marquardt, I., Wiederanders, B., Hanson, H., (1973) FEBS Letters 37, 238-240

4. Ansorge, L., Kirschke, H., Köhler, E., Langner, J., Römer, P., Wiederanders, B., (1977) Acta Bio. Med. Germ. 36, 1713-1721

5. Assoian, R.K., Targer, H.S. (1982) J. Biol. Chem. 257, 9078-9085

6. Assoian, R.K., Thomas, N.E., Kaiser, E.T., Targer, H.S., (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 5147-5151

7. Axelsson, K., Eriksson, S., Mannervik, B., (1978) Biochemistry 17, 2978-2983

8. Baldwin, D.Jr., Terris, S., Steiner, D.F. (1980) J. Biol. Chem. 255, 4028-4032

9. Barratt, A.J. McDonald, J.K., (1980), in "Mammalian Proteases, a Glassary and Bibilography" Volume 1, Endopeptidase 338-350, Academic Press, London, New York

10. Bergeron, J.J.M., Evans, W.H., Geschwind, I.I., (1973) J. Cell Biol. 79, 771-776

11. Bergeron, J.J.M., Sikstrom, R., Hand, A.R., Posner, B.J., (1979) J. Cell Biol. 80, 427-443

12. Blackard, W.G., Guzelian, P.S., Small, M.E. (1978) Endocrinology 103, 548-553

13. Brewker, C.F., Riehm, J.P. (1967) Anal. Biochem. 18, 248-255

14. Brockelhurst, K., Little,G. (1973) Biochem. J. 133, 67-80

15. Brockelhurst, K., Carlsson, J., Kierstan, M.P.J., Crook, E.M. (1973) Biochem. J. 133, 573-584

16. Broh-Kahn, R.H., Mirsky, J.A. (1949) Arch. Biochem. Biophys. 20, 10-15

17. Brush, J.S. (1971) Diabetes 20, 140-145

18. Brush , J.S., Jehring, H. (1979) Endocrinology 104, 1639-1643

19. Brush, J.S., Nascimento, C.G. (982) Biochim. Biophys. Acta 704, 398-402

20. Brush, J.S., Sonne, O., Gliemann, J. (1983), Biochim. Biophys. Acta 757, 269-273

21. Camu, F. (1975) Eur. J. Clin. Invest. 5, 101

22. Capeau, J., Picard, J., Caron, M. (1978) Cancer Res. 38, 3930-3937

23. Carmichael, D.F., Morin, J.E., Dixon, J.E. (1977) J. Biol. Chem. 252, 7163-7167

24 Caro, J.F., Amatruda, J.M. (1980) J. Biol. Chem. 255, 10052-10055

25. Caro, J.F., Amatruda, J.M. (1981) Am J. Physiol. 240 Endocrinol. Metab. 3, E325-E332

26. Caro, J.F., Folle, F., Cecchin, F., Sinha, M.K. (9183) Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 375-382

27. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Amherdt, M., Van Obberghen, E., Kahn, R., Orci, L. (1978) J. Clin. Invest. 61, 1057-1070

28. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Freychet, P., Le Cam, A., Orci. L. (1979) J. Clin. Invest. 63, 1249-1261

29. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Barazzone, P., Freycht, P., Le Cam, A., Orci, L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 2803-2807

30. Carpentier, J.-L., Gorden, P., Freycht, P., Le Cam, A., Orci, L. (1979) Experientia 35, 904-906

31. Chandler, M.L., Varandani, P.T. (1975) Bioch. Biophys. Acta 397, 307-317

32. Chandler, M.L., Varandani, P.T. (1975) Biochemistry 14, 2107-2114

33. Cheetham, P. (1979) Anal. Biochem. 92, 447-452

34. Chen, R.F. (1969) Anal. Biochem. 25, 412-416

35. Chowdhary, B.K., Smith, G.D., Mahler, R., Peters, T.J. (9183) Bioscience Report 3, 323-329

36. Clark, S., Harrison, L.C. (1982) J. Biol. Chem. 257,12239-12244

37. Clark, S., Harrison, L.C. (1983) J. Biol. Chem. 258, 11434-11437

38. Cuatrecasas, P. (1971) Proc. Natl. Aca. Sci. USA 68, 1264-1268

39. Davis, B.J. (1964) Ann. N. Y. Acad. Sci. 21, 407-414

40. Deger, A. (1983) Diplomarbeit, Universität Tübingen

41. Desbuquois, B., Aurbach, G.D., (1971) J. Clin. Endocrinol. 33, 732-738

42. Desbuquois, B., Willeput, J., Huet de Froberville, A. (1979) FEBS Letters 106, 338-344

43. Donner, D.B., Corin, R.E. (1980) J. Biol. Chem. 255, 9005-9008

44. Donner, D.B. (1982) Biochem. J. 208, 211-219

45. Draznin,B., Sobmens, C.C., Toothaker, D.R., Sussman, K.E. (1981) Endocrinology 108, 8-17

46. Duckworth, W.C., Heinemann, M.A., Kitabchi, A.E. (9172) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3698-30702

47. Duckworth, W.C. (1976) Biochim. Biophys. Acta 437, 518-530

48. Duckworth, W.C. (1976) Biochim. Biophys. Acta 437, 531-542

49. Duckworth, W.C., Stentz, F., Heinemann, M., Kitabchi, A.E. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 635-639

50. Duckworth, W.C. (1979) Endocrinology 104, 1758-1764

51. Duckworth, W.C. (1981) Endocrinology Reviews 2, 210-233

52. Eckel, J., Reinauer, H. (1982) Biochem. J. 206, 655-662

53. Fairbanks, G., Steck, T.L., Wallach, D.F.H. (1971) Biochemistry 10,2606-2617

54. Fan, J.Y., Carpentier, J.-L., Gordon, P., Van Obberghen, E., Blackett, N.M., Grunfeld, C., Orci, L. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 7788-7791

55. Fleischer, S., Kervina, M. (1974) Methods in Enzymology 31, 3-41

56. Flier, J.S., Kahrn, C.R., Roth, J., Bar, R.S. (1975) Science 190, 63-65

57. Freedman, R.B. (1979) FEBS Letters 97, 201-210

58. Freychet, P., Kahn, C.R., Roth, J., Neville, D.M., Jr. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3953-3961

59. Galardy, R.E., Craig, L.C., Jamieson, J.D., Printz, M.P. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3510-3515

60. Gammeltoft, S., Kirstensen, L.O., Sestoft, L. (1978) J. Biol. Chem. 253, 8406-8413

61. Gliemann, J., Sonne, O. (1978) J. Biol. Chem. 253, 7857-7863

62. Gliemann, J., Sonne, O., Linde, S., Hansen, B. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 87, 1183-1190

63. Gliemann, J., Sonne, O. (1979) Prog. Clin. Biol. Res. 31, 639

64. Goldfine, I.D., Smith, G.J., Wong, K.Y., Jones, A.L. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1368-1372

65. Goldfine, I.D., Jones, A.L., Ardek, G.T., Wong, K.Y., Mooney, J.S. (1978) Science 202, 760-763

66. Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W., Brown, M.S. (1979) Nature 279, 679-685

67. Goldberger, R.F., Epstein, C.J., Anfinsen, C.B. (1963) J. Biol. Chem. 238, 628-635

68. Goldstein, B.J. Livingston, J.N. (1981) Endocrinology 108, 953-961

69. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Fan, J.-Y., Orci, L. (1982) Metabolism 31, 664-669

70. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Freycht, P., Le Cam, A., Orci. L. (1978) Science 200, 782-785

71. Gorden, P., Carpentier, J.-L., Moule, M.L., Yip, C.C., Orci, L. (1982) Diabetes 31. 659-662

72. Gonzelez-Noriega, A., Grubb, J.H., Talkad, V., Sly, W.S. (1980) J. Cell Biol. 85, 839

73. Granner, D., Andreone, T., Sasaki, K., Beale, E. (1983) Nature 305, 549-551

74. Gray, W.R. (1972) Methods in Enzymology 25, 121-128

75. Grisolia, S., Wallace, R. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 22-27

76. Hammons, G.I., Jarett, L. (1980) Diabetes 29, 475-486

77. Hawkins, H.C., Freedman, R.B. (1976) Biochem. J. 159, 385-393

78. Hillson, D.A., Freedman, R.B. (1979) Biochem. Soc. Trans. 7, 573-574

79. Hillson, D.A., Freedman, R.B. (1980) Biochem. J. 191, 389-393

80. Hillson, D.A., Freedman, R.B. (1980) Biochem. J. 191, 373-388

81. Hoffmann, C., Marsch, J.W., Miller, B., Steiner, D.F. (1980) Diabetes 29, 865-874

82. Horikawa, S., Ogaware, H. (1979) Anal. Biochem. 97, 116-119

83. Horvat, A. (1978) J. Cell Physiol. 97, 37-47

84. Horvat, A. (1980) Nature 286, 906-908

85. Huber, C.T., Solomon, S.S., Duckworth, W.C. (1980) J. Clin. Invest. 65, 461-468

86. Hunter, W.M., Greenwood, F.C. (1962) Nature, 194, 495-496

87. Ibbertson, A.L., Freedman, B.J. (1976) Biochem. J. 159, 377-384

88. Inada, Y. (1961) J. Biochem. 49, 217-225

89. Izzo, J.L., Roncone, A.M., Helton, D.L., Izzo, M.L. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 198, 97-109

90. Jacobs, S., Chang, K.-J., Cuatrecasas, P. (1978) Science 200, 1283-1284

91. Jacobs, S., Cuatrecasas, P. (1983) Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 23, 461-479

92. Jarett, L., Kiechle, F.L., Parker, L.C., Macaulay, S.L. (9183) Am. J. Medicine 74, 31-37

93. Jarett, L., Smith, R.M. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1023-1027

94. Jørgenson, K.H., Larsen, K.D. (1980) Diabetologia 19, 546-555

95. Kaden,M., Harding, P., Field, J.B. (1973) J. Clin. Invest. 52, 2016

96. Kasuga, M., Fujita-Yamaguchi, Y., Blithe, D.L., Kahn, C.R. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 2137-2141

97. Katzen, H.M., Stetten, D. (1962) Diabetes 11, 271

98. Katzen, H.M., Tietze, F. (1966) J. Biol. Chem. 241, 3561-3569

99. Katzen, H.M., Sodermann, D.D., Green, B.G. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. 98, 410-416

100. Kelm, S. (1983) Diplomarbeit, Universität Tübingen

101. Kiechle, F., Jarett, L., Popp, D.A., Kotagerl, N. (1980) Diabetes 29, 852-855

102. Kikuchi , K., Larner, J. (1981) Mol. Cell. Biochem. 37, 109-116

103. Kikuchi, K., Larner, J. (1981) Mel. Cell. Biochem. 37, 117-124

104. Kikuchi, K., Schwartz, C., Creacy, S., Larner, J. (1981) Mol. Cell. Biochem. 37, 125-130

105. Klotz, K.N. (1983) Dissertation, Universität Tübingen

106. Koch, R. (1978) Diplomarbeit, Universität Tübingen

107. Koch, R. (1981) Dissertation, Universität Tübingen

108. Kohnert, K.-D., Ansorge, S., Zühlke, H. (1981) Mol. Cell. Endocrin. 22, 305-313

109. Laemmli, U.K. (1970) Nature 227, 680-685

110. Larner, M.D. (1983) Am. J. Med. 74, 38-51

111. Le Cam, A., Freychet, P., Lenoir, P. (1975) Diabetes 24, 566-573

112. Linde, S., Hansen,B. (1974) Int. J. Pept. Protein Res. 6, 157-163

113. Linde, S., Hansen, B. (1980) Int. J. Pept. Protein Res. 15, 495-502

114. Linde, S., Hansen, B., Lernmark, A. (1980) Anal. Biochem. 107, 165-176

115. Linde, S., Sonne, O., Hansen, B. (1981) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 573-579

116. Linde, S., Hansen, B., Sonne, O., Holst, J.J., Gleimann, J. (1981) Diabetes 30, 1-8

117. Lowry, O.H., Rosebrougth, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951) J. Biol. Chem. 193, 265-275

118. Machicao,F., Urumow, T., Wieland, O.H. (1982) FEBS Letters 149, 96-100

119. Madison, L.L., Kaplan, N. (9158) J. Lab. Clin. Med. 52, 927

120. Marshall, S., Olefsky, J.M. (1979) J. Biol. Chem. 254, 10153-10160

121. Marshall, S., Olefsky. J.M. (1980) Endocrinology107, 1937-1945

122. Matimore, G.E., Tietze, F., Stetten, D., Jr. (1951) Diabetes 8, 307

123. Misbin, R.I., Almira, E.C., Buynitzky, S.J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 2157-2162

124. Mirsky, I.A., Broh-Kahn, H.H. (1949) Arch. Biochem. Biophys. 20, 1-9

125. Mirsky, I.A., Perisutti, G. (1957) J. Biol. Chem. 28, 77-83

126. Morin, J.K., Carmichael, D.F., Dixon J.E. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 189, 354-363

127. Müller, G. (1980) Diplomarbeit, Universität Tübingen

128. Neal, G.W., Kitabchi, A.E. (1982) Biochim. Biophys. Acta 719, 259-266

129. Olefsky, J.M., Johnson, J., Lin, F., Edwards, P., Baur, S. (1975) Diabetes 24, 801-810

130. Ooms, A.A., Brunengraber, H., Frandeson, J.R.M. (1968) Acta Diabetol. Lat. 5, 162

131. Ozaki, S., Kalant, N. (1983) Endocrinology 112, 381-383

132. Ozaki, S., Fukushima, N., Klant, N. (1982) Endocrinology 111, 299-307

133. Pearse, B.M.F., Bretscher, M.S. (1981) Ann. Rev. Biochem. 50, 85-101

134. Petri, W., Jr., Rodriguez, J., Pitot, H.C. (1976) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 152, 610

135. Pharmacia fine Chemicals , Affinity Chromatography

136. Pilch, P.F., Czech, M.P. (1979) J. Biol. Chem. 254, 3375-3381

137. Posner, B.J., Patel, B.A., Kahn, C.R., Bergeron, J.M. (1982) J. Biol. Chem. 257, 5789-5799

138. Purello, F., Burnham, D.B., Goldfine, I.D. (9183) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 1189-1193

139. Richterich, R. (1968) Klinische Chemie 2. Auflage, S. 243, Akademische Verlagsgesellschaft, Frankfurt/M.

140. Rubenstein, A.H., Pottenger, L.A., Mako, M., Getz, G.L., Steiner, D.F. (1972) J. Clin. Invest. 51, 912

141. Saltiel, A.R., Doble,A., Jacobs, S., Cuatrecasas, P. (1983) Biochem. Biophys. Res. Cummu. 110, 789-795

142. Schechter, Y. (1983) Endocrinology 113, 1921-1925

143. Schlessinger, J., Schechter, Y., Willingham, M.C., Pastan, J. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2659-2663

144. Smith , J.D., Lin, A.Y.-C. (1981) Science 214, 799-800

145. Smyth, D.G., Nagamatsu, A., Fruton, J.S. (1960) J. Am. Chem. Soc. 82, 4600-4604

146. Smyth, D.G., Blumenfeld, O.O., Koenigsberg, W. (1964) Biochem. J. 91, 589-595

147. Stein, Y., Widnell, C., Stein, O. (1986) J. Cell Biol. 39, 185-192

148. Steiner, D.F. (1976) Diabetes, 26, 322-340

149. Suzuki, K., Kono, T. (1979) J. Biol. Chem. 254, 9786-9794

150. Terris, S., Steiner, D.F. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8389-8398

151. Terris, S., Steiner, D.F. (1976) J. Clin. Invest. 57, 885-896

152. Terris, S., Hofmann, C., Steiner, D.R. (1979) Can. J. Biochem. 57, 459-468

153. Thomas, J.H., Jones, A., Davey, P., Hutchinson, J.S.M. (1976) Biochem. Soc, Trans. 5, 313

154. Tomizawa, H.H. (1962) J. Biol.Chem. 237, 428-431

155. Tsai, J.S., Seeman, M. (1981) Biochim. Biophys. Acta 673, 259-269

156. Van Obberghen, E., Spooner, P.N., Kahn, C.R., Chernick, S.S., Garrison, M.M., Karlsson, F.A., Grunfeld, C. (1979) Nature 280, 500-502

157. Van Obberghen, E., Rossi, B., Kowalski, A., Gazzano, H., Ponzio, G. (1983) Proc. Natl. Aca. Sci. USA 80, 945-949

158. Varandani, P.T. (1966) Biochim. Biophys. Acta 118, 198-201

159. Varandani, P.T., Plumley, H. (1968) Biochim. Biophys. Acta 151, 273-275

160. Varandani, P.T. (1972) Biochim. Biophys. Acta 286, 126-135

161. Varandani, P.T. (1972) Biochim. Biophys. Acta 286, 136-145

162. Varandani, P.T. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 689-696

163. Varandani, P.T. (1974) Biochim. Biophys. Acta 371, 577-581

164. Varandani, P.T., Nafz, M.A., Chandler, M.L. (1975) Biochemistry 14, 2115-2120

165. Varandani, P.T. (1980) in "Insulin, Chemistry, Structure and Function of Insulin and Related Hormons", Brandenburg, D., Wollmer, A., eds., 475-482, de Gruyter, Berlin, New York

166. Varandani, P.T., Darrow, R.M., Nafz, M.A. (1982) Am. J. Physiol. 243, E140-E151

167. Walker, N.D., Edlund, T., Boulet, A.M., Rutter, W.J. (1983) Nature 306, 557-561

168. Welinder, B.S., Linde, S., Hansen, B. (1983) J. Chromatography 265, 301-309

169. Welinder, B.S., Linde, S., Brush, J.S. (1983) J. Chromatography 257, 162-165

170. Wisher, M.H., Dion, D.I., Sonksen, P.H., Thomas, I.H. (1977) Biochem. Soc. Trans. 5, 313

171. Yokono, K., Imamure, Y., Shii, K., Mizuno, N., Sakai, H., Baba, S. (1980) Diabetes 29, 856-859

172. Yokono, K., Roth, R.A., Baba, S. (1982) Endocrinology 111, 1102-1108

173. Zang, S.-R., Shi, O.-H., Ho, R.-J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 6471-6476

174. Zick, Y., Kasuga, M., Kahn, C.R., Roth, J. (1983) J. Biol. Chem. 258, 75-80

L E B E N S L A U F

Am 17. 7. 1950	wurde ich in Bad Soden Main-Taunus-Kreis als zweiter Sohn des Chemielaboranten Friedrich Müller und seiner Ehefrau Pia geb. Müller geboren.
1956 - 1964	Besuch der Volksschule Bad Soden/Ts.
1964 - 1966	Besuch der Handelsschule Hofheim/Ts.
1966 - 1969	Dreieinhalbjährige Textillaborantenlehre bei der Hoechst AG.
1969 - 1972	Besuch der Fachhochschule-Niederrhein mit Abschluß Ingenieur grad.
1972 - 1973	Absolvierung der Grundwehrdienstzeit.
1974 - 1980	Studium der Biochemie an der Universität Tübingen. Abschluß mit Diplomprüfung und Diplomarbeit über "Untersuchung der Insulinabbauaktivität in Triton X-100 Extrakten aus Rattenlebermembranen".
Dezember 1980 - Juli 1984	Arbei an der vorliegenden Dissertation mit dem Thema "Reinigung und Charakterisierung von Insulinabbauaktivitäten aus Rattenlebermikrosomen", am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen, in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. U. Weber.

Meine akademischen Lehrer waren folgende Herren Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	G. Weitzel, D. Mecke, H. Probst, U. Weber, A. Wendel, U. Weser, S. Hörnle, J. Guglielmi
Organische Chemie	M. Hanack, G. Jung, E. Bayer, W. Rundel, H. Stegmann, E. Lindner H. Hagenmaier, W. Voelter
Anorganische Chemie	W. Rüdorff, J. Strähle
Physikalische Chemie	H. Mauser, W. Zeil, H. Oberhammer, D. Oelkrug
Physik	H. Krüger, F. Gönnenwein
Mathematik	H. Pommer
Mikrobiologie	H. Zähner, V. Braun
Botanik	H. Metzner, B. Schwämmle
Zoologie	K. G. Grell
Humanphysiologie	E. Betz
Anatomie	K. Mörike
Histologie	K. Mörike
Pharmakologie	H. Remmer, H. Bolt, E. Pfaff
Medizinische Strahlenkunde	U. Feine, E. Kallee